



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Patrones de expresión de los genes
Notch2, Delta1 y Ser1 en el
desarrollo de arcos faríngeos y
prominencias faciales de embriones
de pollo entre estadios HH14 – HH23**

David Alexander Gutiérrez Ramírez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Maestría de Odontología
Bogotá D.C., Colombia

2014

Patrones de expresión de los genes *Notch2, Delta1 y Ser1* en el desarrollo de arcos faríngeos y prominencias faciales de embriones de pollo entre estadios HH14 – HH23

David Alexander Gutiérrez Ramírez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster de Odontología

Directora:

Carolina Parada Borja, PhD.

Codirector:

Humberto Arboleda Granados, MSc.

Línea de Investigación de Biología del Desarrollo
Grupo de Investigación en Crecimiento y Desarrollo Craneofacial

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Maestría de Odontología
Bogotá D.C., Colombia Dic - 2014

Solo la fe en Dios permitirá que se pueda probar lo impensado, y que suceda lo inimaginable, hasta el punto de convencernos que si nos ponemos una meta y la compartimos en su excelsitud... siempre lo lograremos. Aun cuando tengamos que repetir los experimentos mil veces... como mil errores cometamos.

Agradecimientos

A Dios primero que todo.

Agradezco a todos y cada uno de los integrantes del grupo de investigación de crecimiento y desarrollo craneofacial de la línea de biología del desarrollo. De manera especial a los docentes, la coordinadora, Dra. Clementina Infante por su perseverancia por mantener el rumbo. De igual forma, a la Dra. Carolina Parada por servirme como guía y sobre todo, un modelo a seguir. Al Dr. Humberto Arboleda por su colaboración y apoyo logístico en la consecución de recursos. A Francy y a Belfran por acogerme, instruirme y motivarme. Y a todos los demás profesores de la Maestría de Odontología que siempre serán referentes de vida.

A mis familiares, sobre todo mi esposa e hijos que supieron entenderme y apoyarme en la distancia. Mis padres y hermanos que siempre estuvieron allí para lo que necesitara en este corto retorno a mi ciudad natal, ese calor que siempre quedará impregnado en mi ser.

Por último, a todos los compañeros, profesores y colaboradores del instituto de genética de la Universidad Nacional, quienes brindaron esa esperanza por salir adelante en los experimentos.

Resumen

La vía de señalización Notch cumple un rol importante en el desarrollo embrionario ya que alteraciones de la vía se han asociado con malformaciones de diversas estructuras, incluido el complejo craneofacial. El presente estudio tiene como objetivo describir los patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Delta1* y *Serrate1* durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales de embriones de pollo. Para ello se hizo hibridación in situ en embriones de pollo *Gallus gallus* en estadios entre HH14 y HH23 en *whole mount* (embrión completo) y en secciones tanto sagitales como coronales. Como resultados, se observa que el patrón de *Ser1* y *Notch2* es muy similar, sus dominios se mantienen en todos los estadios en el epitelio faríngeo de las hendiduras. En cuanto a las prominencias, *Ser1* y *Notch2* se expresan en el epitelio de prominencia maxilar y mandibular y en los arcos branquiales 2 y 3. Por otra parte, *Delta1* sólo se expresa en el epitelio de la primera hendidura en HH14 y de menor intensidad en estadio HH23 en prominencia maxilar y mandibular. Estos resultados sugieren que la vía podría estar activa a través de *Ser1/Notch2/Hey1* y posiblemente involucra eventos que toman lugar durante este periodo de desarrollo en la morfogénesis facial, como proliferación celular, diferenciación o apoptosis. De otro lado, por su expresión en bolsas faríngeas se puede presumir que participa en la segmentación de los arcos branquiales, y en el establecimiento del patrón dorso - ventral de prominencias faciales.

Palabras clave: Vía de Señalización Notch, Desarrollo Craneofacial, Arcos Branquiales, Prominencias Faciales, Notch2, Delta1, Jagged1

Abstract

The Notch signaling pathway plays an important role during embryonic development. Disruption in this pathway leads to malformations affecting diverse organs, including the craniofacial complex. The aim of this work is to describe gene expression patterns of Notch2, Delta1 and Serrate1 during the development of pharyngeal arches and facial prominences in chick embryos. Embryos of *Gallus gallus* at five stages between HH14 and HH23 were used for this purpose. Whole-mount in situ hybridization was performed. Subsequently, the embryos were sectioned sagittally and coronally, and the hybridization was performed on sections for a detailed analysis. The expression patterns of Ser1 and Notch2 are very similar, and are maintained throughout the analyzed stages in the epithelium of the branchial clefts. In the prominences Ser1 y Notch2 are expressed in the ventral epithelium of the maxillary and mandibular prominences and in the branchial arches 2 and 3. On the other hand, Delta1 is expressed only in the epithelium of the first cleft at stage HH24 and weakly at stage HH23 in the maxillary and mandibular prominences. These findings suggest that the Notch pathway could be active through Ser1/Notch2/Hey1 likely controlling events that occur at these stages of facial morphogenesis, such as cell proliferation, differentiation, or apoptosis. From the expression patterns in the branchial clefts, we assume that they participate in the segmentation process of the branchial arches, and the dorso-ventral patterning of facial prominences.

Keywords: Notch signaling Pathway, Craniofacial Development, Branchial Arches, Facial Prominences, Notch2, Delta1, Jagged1.

Tabla de Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XVII
Lista de tablas	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas	XXV
Introducción	1
1. Marco conceptual	3
1.1 Crecimiento y desarrollo craneofacial	3
1.2 Vía de Señalización Notch.....	15
1.3 Desordenes craneofaciales	21
2. Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser 1 y Del 1	27
2.1 Materiales y métodos.....	27
2.1.1 Obtención de embriones de pollo.....	27
2.1.2 Obtención de plásmidos y síntesis de sonda.....	28
2.1.3 Hibridación In situ	28
2.1.4 Hibridación en cortes histológicos.....	28
2.2 Resultados.....	29
2.2.1 Controles positivos	30
2.2.2 Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1, en HH 14	30
2.2.3 Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1, en HH 16....	31
2.2.4 Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1, en HH 19....	32
2.2.5 Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1, en HH 21	33
2.2.6 Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1, en HH 23....	34

2.3	Discusión	35
	2.3.1 El rol de la vía de señalización Notch en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales.....	36
	2.3.2 Establecimiento del patrón dorso ventral de arcos branquiales.....	36
	2.2.3 El presumible rol de Ser1/Notch2/Hey1 en la segmentación faríngea ...	38
	2.2.4 Posible interacción de Notch con otras vías en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales.....	38
	2.2.5 Las señales en el epitelio caudal del segundo AB podría constituirse como un centro de señalización faríngeo	39
2.4	Conclusiones y Recomendaciones.....	40
3.	Consideraciones éticas	41
	3.1 Consideraciones ético-legales y ambientales	41
	3.2 Divulgación y propiedad intelectual.....	42
A.	Anexo. Protocolo de Hibridación In situ sobre embrión completo	46
B.	Anexo. Protocolo de Hibridación In situ sobre cortes.....	47
	Bibliografía	49

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Arcos y hendiduras branquiales.....	4
Figura 1-2: Capas germinales que forman los arcos y hendiduras branquiales.	5
Figura 1-3: Prominencias faciales, vista lateral.....	7
Figura 1-4: Prominencias faciales, vista frontal.....	8
Figura 1-5: Expresión génica en Arcos Branquiales y Prominencias Faciales	10
Figura 1-6: Expresión génica de los genes Hey 1 y Hes 1.....	14
Figura 1-7: Vía de señalización Notch	16
Figura 1-8: Receptores Notch.....	18
Figura 1-9: Ligandos de la vía Notch	19
Figura 2-1: Controles positivos de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1	29
Figura 2-2: Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1 en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH14.....	30
Figura 2-3: Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1 en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH16.....	31
Figura 2-4: Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1 en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH19.....	32
Figura 2-5: Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1 en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH21.....	33
Figura 2-6: Patrones de expresión de los genes Notch2, Ser1 y Dll1 en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH23.....	34

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Prominencias faciales y sus estructuras derivadas en humanos y en pollos.....	9
Tabla 1-2: Patrones de expresión génica durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en pollos en estadios HH14.. ..	10
Tabla 1-3: Patrones de expresión génica durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en pollos en estadios HH16 19 21 y 23.....	11

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AB	Arcos Branquiales
BMP	Proteína Morfogenética
CCN	Células derivadas de la Cresta Neural
CCNC	Células derivadas de la Cresta Neural Craneal
DICN	Dominio intracelular de Notch
<i>Dll1</i>	Delta 1
<i>DSL</i>	Delta Serrate Lag
DIG	Digoxigenina
EGF	Factor de Crecimiento Endotelial (Abreviatura en Inglés)
FEZ	Zona Ectodérmica frontal (Abreviatura en Inglés)
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico (Abreviatura en inglés)
HIS	Hibridación In Situ
H	Hendidura
<i>Jag1</i>	Jagged 1
kDa	KiloDaltones
MN	Mesonefros
NECD	Dominio extracelular de Notch (Abreviatura en inglés)
NTMD	Dominio transmembranal de Notch (Abreviatura en inglés)
O	Ojo
PBS	Buffer fosfato salino (Abreviatura en inglés)
PMd	Prominencia Mandibular
PMx	Prominencia Maxilar

PFN	Prominencia fronto nasal
PNL	Prominencia nasal lateral
PO	Placoda olfatoria
<i>mRNA</i>	RNA mensajero
TAD	Dominio trans-activacional (Abreviatura en inglés)
VO	Vesícula ótica
<i>Ser1</i>	Serrate 1

Introducción

La vía de señalización Notch es una de las vías esenciales en diversas etapas del desarrollo embrionario. Se caracteriza por su efecto pleiotrópico, lo que incluye su posible intervención en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales, precursores de gran parte de la morfogénesis craneofacial. Esta vía es aparentemente simple en su diseño. En humanos está compuesta por 5 ligandos (Delta, Serrate), 4 receptores (Notch 1 - 4) y dos familias de genes diana (Hes y Hey), pero su versatilidad y función la hacen bastante compleja. (Andersson, Sandberg, y Lendahl, 2011).

Investigaciones recientes han demostrado que la alteración de alguno de los componentes de esta vía en etapas tardías del desarrollo pueden generar anomalías con consecuencias considerables, tales como malformaciones sindrómicas y no sindrómicas, tumores, e incluso desencadenar cáncer, entre otras alteraciones reportadas (Miele, Golde, y Osborne, 2006; Nowell y Radtke, 2013; Talora et al., 2008; Yavropoulou y Yovos, 2014). Está descrita específicamente la asociación del desbalance de miembros de la vía con malformaciones craneofaciales, como por ejemplo Ser2 y el Síndrome de Alagille (McDaniell et al., 2006), Notch2 y el síndrome de Hadju-Cheney (Gu et al., 2013), y otras malformaciones no sindrómicas (Isidor, Lindenbaum, et al., 2011) que incluyen desórdenes musculo-esqueléticos-craneofaciales.

La morfogénesis craneofacial es el resultado de interacciones espacio-temporales complejas entre diferentes componentes celulares y tisulares durante el periodo embrionario (Gitton et al., 2010). Al igual que en la morfogénesis de diferentes órganos, en la formación de los arcos branquiales y prominencias faciales, la proliferación, diferenciación, apoptosis celular, así como en el mantenimiento de poblaciones de células madre son procesos celulares esenciales. La alteración de uno sólo de dichos procesos o de los componentes celulares o tisulares puede llevar a malformaciones severas y masivas de la estructura embrionaria en diferentes modelos animales como ratones, pollos (Ishii et al., 2012; Tavares et al., 2012) y pez cebra (Delaurier et al., 2012).

En el estudio del desarrollo embrionario en fases iniciales, uno de los modelos frecuentemente utilizado es el embrión de pollo ya que ofrece ventajas considerables por su corto periodo de desarrollo, costo de mantenimiento y la similitud fenotípica en estadios iniciales con el humano. La vía de señalización Notch, en este modelo animal, ha sido estudiada en morfogénesis de oído, ojo, corazón, sistema vascular y ampliamente en neurogénesis (Bento, Correia, Tavares, Becker, y Belo, 2011; Pujades, Kamaid, Alsina, y Giraldez, 2006). Sin embargo, existe un vacío en la literatura acerca de su papel en el desarrollo temprano de estructuras craneofaciales, como por ejemplo en el proceso de formación de los arcos branquiales y prominencias faciales.

Dentro de los objetivos planteados en el presente estudio está describir los patrones de expresión de algunos de los genes pertenecientes a la vía de señalización Notch: el receptor *Notch2*, y los ligandos *Delta1* y *Serrate1*, durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales de embriones de pollo. Es de gran importancia tener un conocimiento completo de los mecanismos moleculares subyacentes para poder avanzar en la comprensión del desarrollo craneofacial (Minoux y Rijli, 2010). Es claro ahora, que el componente genético en el desarrollo es muy importante, por lo tanto, el análisis sistemático de genes en la embriogénesis y el desarrollo de la región craneofacial (Rahul y Amol, 2012), se debe constituir en un objetivo común de la investigación en el área de la biología del desarrollo craneofacial.

La metodología empleada inicia con la obtención de embriones de pollo (*Gallus gallus*) en los estadios HH14, HH16, HH19, HH21 y HH23, en los que se utilizó la técnica de hibridación in situ (HIS) para analizar la expresión de los genes *Notch2*, *Serrate1* (*Ser1*) y *Delta1* (*Dll1*) examinados en embrión completo (Whole mount). Posteriormente, se incluyeron otra serie de embriones en parafina y se seccionaron en cortes sagitales y coronales de 6µm, sobre los que se realizó HIS sobre las placas, que luego se analizaron en estereomicroscopio y por último, el registro fotográfico.

En los resultados se observa que el patrón de *Ser1* y *Notch2* es muy similar, sus dominios se mantienen en todos los estadios en el epitelio faríngeo de las hendiduras; en cuanto a las prominencias. *Ser1* y *Notch2* se expresan en epitelio y mesénquima ventral de prominencia maxilar y mandibular y en los arcos branquiales 2 y 3. Por otra parte, *Delta1* sólo se expresa en el epitelio de la primera hendidura en HH14 y con señal menos intensa en estadio HH23 en prominencia maxilar y mandibular. Estos datos complementan la información obtenida en trabajos anteriormente realizado con los genes *Notch1*, *Serrate2*, *Hes1* y *Hey1* (Bayona, 2012; Carbonell, 2012), resultados publicados dentro de la línea de investigación de Biología del desarrollo, del grupo de investigación de Crecimiento y Desarrollo Craneofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional – Sede Bogotá. Los resultados en conjunto, sugieren que la vía permanece activa desde el estadio HH14 hasta HH23, y posiblemente el ligando *Ser1* es el que activa a *Notch2*, y este a su vez activa a *Hey1*, cumpliendo un rol importante en el desarrollo craneofacial.

Se requieren de más estudios experimentales para determinar el rol de cada componente y su asociación con los eventos celulares tales como proliferación, apoptosis entre otros, que se presentan normalmente durante el crecimiento y desarrollo facial.

1. Marco conceptual

1.1 Crecimiento y desarrollo craneofacial

La formación de las estructuras que conforman la cara y el cráneo se da entre la 4ª y 8ª semana de desarrollo intrauterino en humanos, y es muy similar en diferentes especies animales en estas etapas iniciales del desarrollo. Los diferentes componentes de la cara se originan en su mayor parte de células de la cresta neural craneal (CCNC) que migran desde el tubo neural en desarrollo hacia la región craneal donde gracias a su pluripotencialidad y su interacción con el ectodermo, endodermo y mesodermo contribuyen al desarrollo de los diferentes tejidos craneofaciales (Richtsmeier y Flaherty, 2013).

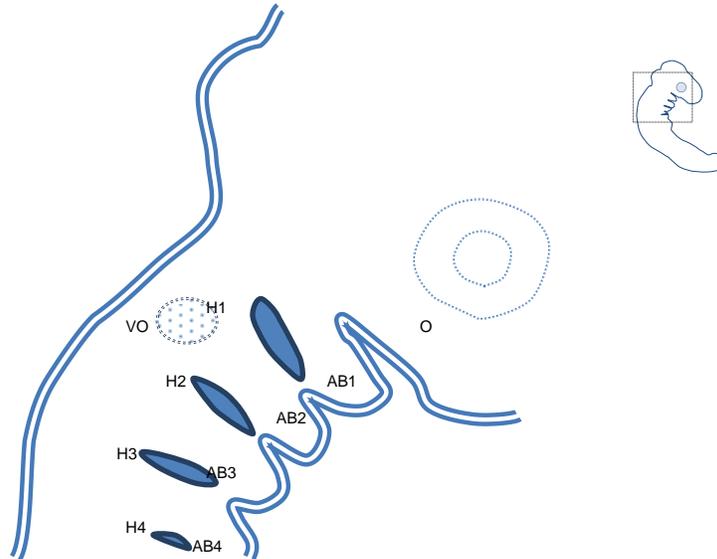
Uno de los destinos de las CCN contribuye con la formación de los arcos branquiales. De estos, el primer arco faríngeo contribuye con el desarrollo del tercio inferior y medio facial, incluyendo tanto la mandíbula como el maxilar superior, lo que hace a los arcos branquiales una estructura importante para el estudio del desarrollo facial, (Nie, Wang, y Jiao, 2011). Las estructuras que conformarán la cara y una parte del cráneo se derivan de primordios, conocidos también con el nombre de prominencias o procesos faciales. Además de los dos procesos maxilares y dos mandibulares, provenientes del primer arco, la cara embrionaria también está constituida por el proceso frontonasal, del cual se derivan dos procesos nasales laterales y dos procesos nasales mediales (Cerny et al., 2004). Se mostrará en detalle, los arcos branquiales, las prominencias faciales y los eventos moleculares que enmarcan el desarrollo de estas estructuras:

1.1.1. Arcos Branquiales.

Los arcos branquiales (AB), también llamados arcos faríngeos, son estructuras conservadas evolutivamente en cordados. Se forman lateralmente en la región faríngea en desarrollo. Su número puede variar entre las especies, de tal manera que en humanos se pueden contar 5 arcos branquiales desde el primer arco hasta el sexto, con la particularidad, que al igual que en pollos, el quinto arco no se desarrolla. Otras especies como el pez cebra, poseen más de cinco arcos. La aparición de los arcos branquiales tiene un patrón cefalocaudal, donde el más cefálico es el primero (AB1) (Graham, 2003).

En la medida que avanza el desarrollo se forman invaginaciones externas que generan unos espacios que separan los arcos entre sí, conocidos como hendiduras branquiales o faríngeas, se nombran también cefalo-caudalmente, siendo la ubicada entre AB1 y AB2, la primera hendidura (H1). También se puede reconocer una estructura anatómica en esta zona, la vesícula ótica, ubicada dorsalmente a AB2 (Figura 1-1)

Figura 1-1. Arcos y hendiduras branquiales. Vista sagital de embrión de pollo de 54 horas post incubación. El recuadro muestra la zona ampliada de los arcos y hendiduras branquiales enumerados cefalo - caudalmente. (O) copa óptica, (VO) vesícula ótica, (AB) arcos branquiales 1-4, (H) hendiduras 1-4. La doble línea azul representa el epitelio.

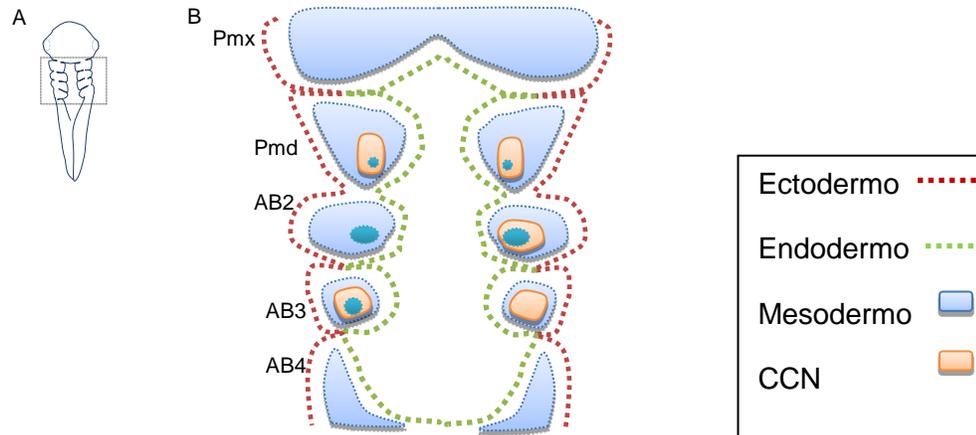


Todos los arcos están conformados por células de las tres capas germinales. La parte externa cubierta por ectodermo, la parte interna y en contacto con el aparato faríngeo está cubierta por tejido endodérmico y la región central está conformada por mesénquima derivado de células mesodermales y CCNC. (Figura 1-2) (Graham, Begbie, y McGonnell, 2004). La interacción entre estos tejidos ha demostrado que la señalización entre el ectodermo facial y el mesénquima es de suma importancia en la formación de la cara. (Li y Williams, 2013).

Aunque las estructuras derivadas de los arcos branquiales son comunes en muchas especies, hay algunas en las que se han reportado diferencias y cuyo estudio evolutivo aún se encuentra en investigación. Las principales estructuras derivadas de los AB son vitales en su mayoría. Del AB1 se origina el maxilar, mandíbula, receso tubotimpánico, epitelio de cavidad timpánica, trompa de eustaquio, membrana timpánica y la mayoría de músculos faciales. El AB2 origina la glándula tiroidea, epitelio de amígdalas (excepto en roedores) y glándulas salivales en aves. El AB3 por su parte origina el timo, glándulas paratiroides inferiores; y el AB4, las glándulas paratiroides superiores. La lengua se forma a partir de células derivadas de los arcos 1, 2 y 3, principalmente del primero (Grevellec y Tucker, 2010; Minoux, Antonarakis, Kmita, Duboule, y Rijli, 2009).

Los AB crecen en dirección dorsolateral a ventromedial en todo su eje, a excepción de AB2 que además crece sobre su eje anteroposterior. La porción posterior de AB2 crece cubriendo AB3 y AB4 y en la medida que avanza el desarrollo, el ectodermo de AB2 y el de AB4 se van fusionando dando lugar a una cavidad denominada seno cervical (Grevellec y Tucker, 2010), que normalmente se presenta en esta etapa del desarrollo, pero que en algunos casos se mantiene abierta.

Figura 1-2. Capas germinales que conforman los arcos y hendiduras branquiales. A) Vista frontal de embrión de pollo 54 horas post incubación. B) Corte coronal ampliado de la zona de arcos y hendiduras branquiales.



Las bases moleculares que gobiernan el desarrollo de los arcos branquiales y sus hendiduras se vienen estudiando desde hace varias décadas en trabajos de expresión génica en modelo de pollo. Éstos han descrito el papel que juegan la *Bmp4*, *Bmp7*, *Fgf8* y *Shh*, éste último se expresa durante el estadio HH18 a lo largo del margen posterior del epitelio del segundo arco (Swartz, Nguyen, McCarthy, y Eberhart, 2012). En éste mismo estadio se observa una marcada expresión de *Bmp4* en el arco maxilar y en la zona más ventral de AB1 y AB2; en cuanto a *Bmp7* se mantiene una expresión localizada en las hendiduras 1, 2 y 3 durante los estadios HH14, HH16 y HH18, además en el margen posterior del epitelio de AB2, sobretodo en HH16. La expresión de *Fgf8* se ubica a lo largo del ectodermo de los 3 primeros arcos, comprobando una coexpresión entre *Bmp7* y *Fgf8* (Wall y Hogan, 1995).

En un trabajo más reciente realizado en pollos se comprobó que la expresión de *Tgfβ2* en el mesénquima de arcos reporta una similitud con el patrón que se presenta en ratón, y juega un papel relevante en la proliferación, migración y muerte celular; probando además la versatilidad del modelo de pollo para el estudio de la embriogénesis (Yamagishi, Ando, Nakamura, y Nakajima, 2012).

También se han descrito varios factores de transcripción que se expresan en arcos branquiales, como por ejemplo *Foxi2* y *Foxi3* tanto en endodermo como en ectodermo (Khatri y Groves, 2013). También se identificaron transcritos del gen *Sisha* en zona de AB (Hedge y Mason, 2008), y sobre todo la expresión de *Msx1* y *Msx2* enmarca eventos de suma importancia en las CCN que conforman la organogénesis facial (Foerst-Potts y Sadler, 1997), y se relaciona principalmente con la diferenciación celular durante las etapas de desarrollo facial.

En el grupo de investigación de crecimiento y desarrollo craneofacial, de la maestría de odontología de la Universidad Nacional de Colombia, demostraron que los componentes de la vía de señalización *Notch*, *Notch1*, *Ser2*, *Hes1* y *Hey1* están presentes durante los estadios HH14 a HH18 del desarrollo del embrión de pollo, en los estadios iniciales de formación de los AB, particularmente, la expresión del gen *Ser2* no mostró una señal lo

suficientemente clara que permita sospechar de una función importante en el direccionamiento de la formación de las bolsas, hendiduras y AB. (Bayona, 2012).

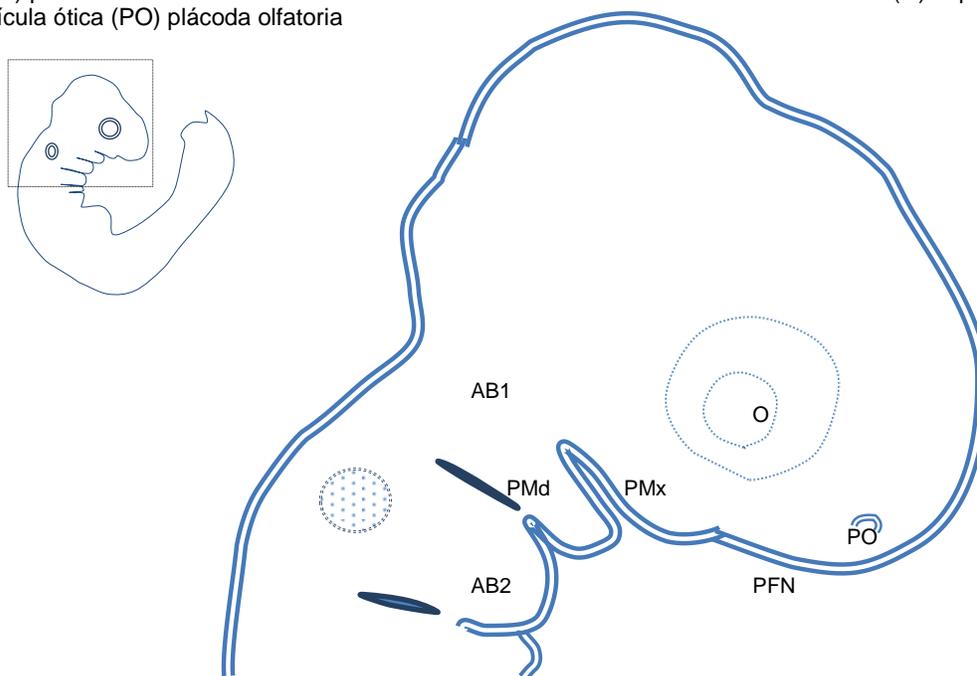
Además se reportó que los patrones de expresión de los genes diana *Hes1* y *Hey1*, no son coincidentes con los de *Ser2*, lo que supone que son genes efectores por medio de otros ligandos de la vía Notch o a través de otras vías de señalización celular; por otra parte, los patrones de expresión de *Hes1* y *Hey1* en estadios tempranos y en sitios clave de la segmentación faríngea, podrían significar algún tipo de regulación de estos genes en la proliferación celular necesaria para definir límites anatómicos y dar forma a los AB (Bayona, 2012).

En un estudio reciente comprobaron el importante papel que cumple *Hes1* en el mantenimiento de la células de mesénquima poblado por células de la cresta neural de los arcos branquiales (Kameda et al., 2013), en donde se reconoció que la mutación de *Hes1* en CCN disminuye la proliferación de estas células en el mesénquima, afectando sensiblemente el normal desarrollo de los arcos faríngeos.

1.1.2. Prominencias faciales

La morfogénesis facial se origina a partir de cinco primordios fundamentales, también conocidos como prominencias faciales que se ubican alrededor de la boca primitiva o estomodeo, aproximadamente a partir de la cuarta semana del desarrollo embrionario humano. Estos son, una prominencia frontonasal, dos maxilares y dos mandibulares, que presentan una mínima divergencia fenotípica entre el humano y modelos como ratón, pollo y cerdo, entre otros (Liu, Rooker, y Helms, 2010).

Figura 1-3. Prominencias faciales, vista lateral. Embrión de 96 horas post incubación donde se evidencia la formación de la (Pmx) prominencia maxilar, (Pmd) prominencia mandibular, (AB) arcos branquiales 1 y 2, y (PFN) prominencia frontonasal. Además se observan otras estructuras cercanas como: (O) copa óptica, (VO) vesícula óptica (PO) plácoda olfatoria

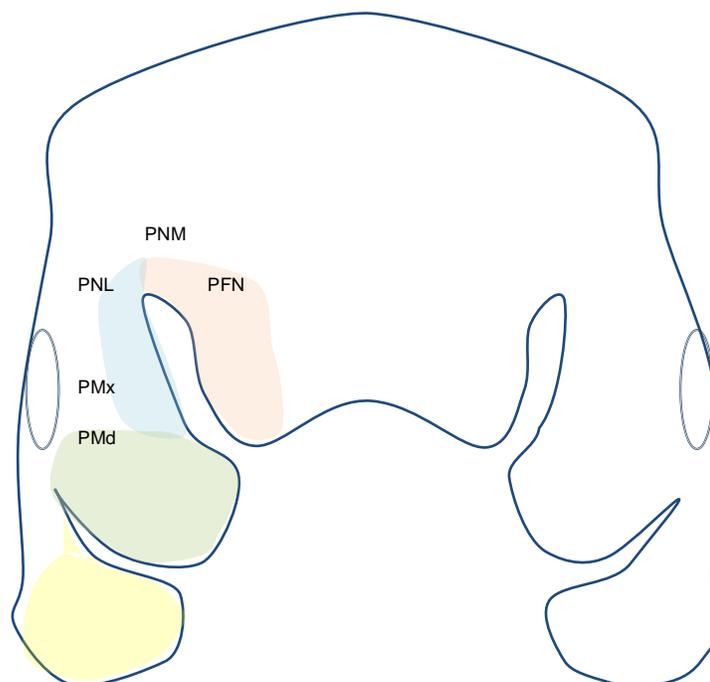


La prominencia frontonasal (PFN) es la más voluminosa, está conformada por el mesénquima y el ectodermo frontonasal: el primero está localizado ventral a la región anterior del prosencéfalo, derivado de las CCNC; y el segundo, es la capa de epitelio más externa que la recubre (Cordero et al., 2011). En la medida que avanza el desarrollo, la PFN crece ventralmente y desciende hasta encontrarse con las dos prominencias maxilares. Además, se extienden dos prominencias alrededor de la plácoda nasal, una medial y otra proximal, que se conocen con el nombre de prominencia nasal medial (PNM) y prominencia nasal lateral (PNL), ésta última dará lugar al ala de la nariz (Arredondo de Arreola, Lopez Serna, de Hoyos Parra, y Arreola Salinas, 1996). El resto de la prominencia forma el tercio superior y central de la cara, constituyendo la frente y la nariz principalmente. (Figura 1-3, 1-4).

Como se había referenciado anteriormente, los procesos maxilares y mandibulares, provienen del primer arco branquial, un evento altamente conservado en muchas especies (Yelick y Schilling, 2002), pero cuyo patronamiento es sensiblemente diferente por la variación en la expresión génica que se da de especie a especie; se ha llegado a probar que la mandíbula está poblada en su mayoría por células que provienen de AB1, mientras que el proceso maxilar también está constituido por otros linajes celulares. (S. H. Lee, Bedard, Buchtova, Fu, y Richman, 2004). La formación de la mandíbula se da entre la 4^a y 9^a semana de desarrollo en los humanos, mientras que en los pollos se forman entre el estadio HH18 y HH25

La etapa del desarrollo que precede a la fusión de los procesos maxilares con los nasales mediales se conoce como la etapa de prefusión, que es un periodo corto de tiempo en el que los epitelios de cada uno de los procesos están muy cercanos pero aún no se contactan, estos epitelios se conocen con el nombre de periderma. Las diferentes interacciones entre epitelios marcarán los destinos de las células comprometidas en este proceso (Jiang, Bush, y Lidral, 2006).

Figura 1-4. Prominencias faciales. Vista frontal de la cabeza de un embrión durante la morfogénesis facial a partir de las prominencias faciales: (PFN) prominencia frontonasal, (PNL) prominencia nasal lateral, (PNM) prominencia nasal medial, (PMx) prominencia maxilar, (PMd) Prominencia mandibular.



El paladar primario se forma por la fusión de los procesos nasales mediales, y el secundario por la fusión de los procesos palatinos de la prominencia maxilar. Dado el contacto de las PNM, los epitelios se desintegran para realizar la correspondiente confluencia mesenquimal. En el pollo, en el estadio HH23 – 26, aproximadamente 5-6 semana en humanos, las primeras células que entran en apoptosis son las del periderma de los dos procesos maxilares, seguido por las del proceso frontonasal. La actividad de muerte celular programada continúa hasta el estadio HH 28 donde el epitelio ya desaparece totalmente y se integran las células mesenquimales provenientes de los procesos fusionados (Sun, Baur, y Hay, 2000). Aunque se ha encontrado que la desintegración epitelial ocurre casi exclusivamente por muerte celular (Cuervo y Covarrubias, 2004) también se ha reconocido que no todas las células del epitelio se desintegran, algunas pocas migran y otras toman un destino diferente, o sea se transforma en un fenotipo mesenquimal (Martinez-Alvarez et al., 2000), generando una clara controversia y cuyas bases moleculares aún no están completamente entendidas (Iseki, 2011). Particularmente, en el modelo pollo el fenotipo es diferente dado que prevalece una hendidura palatina por naturaleza (Hamburger y Hamilton, 1992). Las diferentes estructuras esqueléticas faciales provienen específicamente de una prominencia y se pueden diferenciar del resto de estructuras (Tabla 1-1).

Un evento esencial en la formación de la mandíbula es la aparición del cartílago de Meckel (CM), que en pollos ocurre aproximadamente alrededor del estadio HH21. El CM se forma por condensación de células mesenquimales derivadas de las CCN y gracias a las interacciones con el epitelio oral. A partir del estadio HH24 se darán los procesos de condrogénesis y osteogénesis, de manera similar a lo que sucede en humanos (S. K. Lee et al., 2001). El CM eventualmente se degrada.

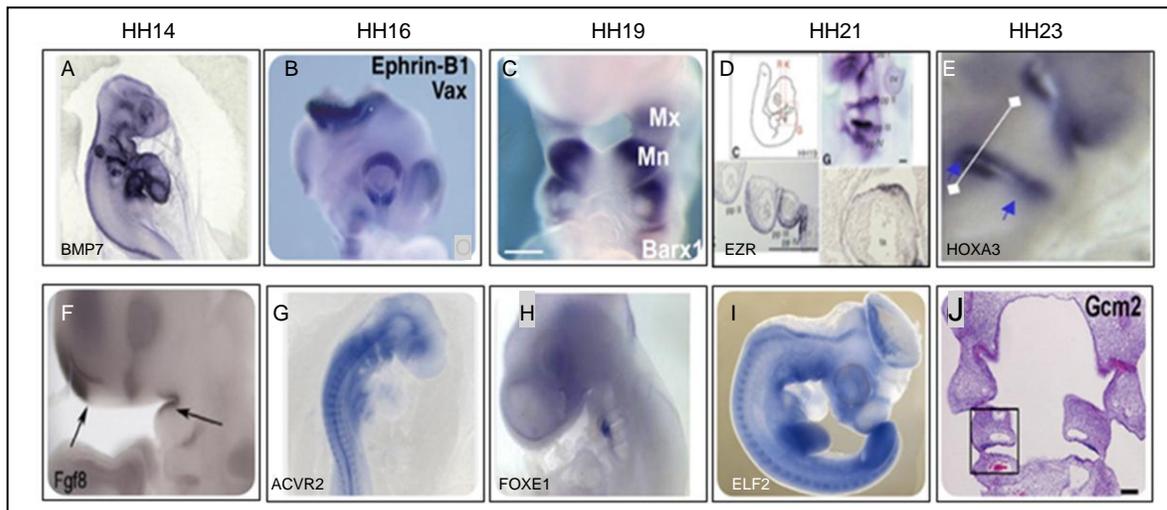
Tabla 1-1. Prominencias faciales y sus estructuras derivadas en humanos y en pollos.

PROMINENCIA	ESTRUCTURAS ESQUELÉTICAS	
	HUMANOS	POLLOS
Prominencia Frontonasal	Frente, filtrum de nariz, filtrum de labio, paladar primario y dientes incisivos superiores	Premaxila, cartílago lateral prenasal
Prominencia nasal lateral	Ala de la nariz	Cornetes nasales
Prominencia maxilar	Bordes laterales del labio superior, paladar secundario, hueso maxilar superior y dientes caninos, premolares y molares	Hueso palatino, maxilar yugal y hueso queratoyugal
Prominencia mandibular	Cartílago de Meckel, mandíbula con toda la dentición	Hueso angular, suprangular, articular, esplénico dentario y mentomandibular

Por otro lado, las bases moleculares que enmarcan el desarrollo prominencias faciales no se comprenden en su totalidad, y es quizás más acertado decir que hasta ahora se están dilucidando. Específicamente en el modelo de pollo se tienen reconocidos aproximadamente 520 genes que participan en alguno o en varios estadios del desarrollo de estas mencionadas estructuras, por ejemplo, el papel que cumple *Msx1* es indispensable para la correcta formación de las estructuras faciales, sus patrones de expresión se localizan en la PFN y PMx y están asociados con proliferación celular; de igual forma se comprobó además que su interacción con *Wnt/βCatenin* también promueve el crecimiento de las PMx (Medio et al., 2012).

Es importante reconocer que algunos genes tienen patrones de expresión muy específicos, que tan solo se expresan en una sola estructura y durante un estadio de desarrollo, como es el caso de *Aebp2* que se expresa únicamente en HH16 (Antin, Bell, y Yatskievych, 2004) y solo en AB2, mientras que existen otros genes que mantienen sus patrones durante varios estadios de desarrollo, tal es el caso de *Elf4* (Figura 1-5, I) que se expresa en mesénquima facial con un patrón oscilatorio. Y por último, también se presentan aquellos que tienen patrones de expresión durante varios estadios y en diferentes estructuras, como es ejemplo *EphA3* que mantiene la expresión desde HH19 hasta HH 24 en AB2, AB3 y AB4 (Antin et al., 2004).

Figura 1-5. Expresión génica en AB y PF. Algunos ejemplos de expresión de genes de diferentes vías y en estadios de desarrollo de pollo desde HH14 hasta HH223



Del sinnúmero de moléculas y de vías que se activan en la embriogénesis, hay que resaltar que algunas tienen expresiones en diferentes estructuras del organismo y otras son muy específicas a los AB y PF (Darnell et al., 2007). Y también cabe reconocer que las células en las que se expresan pueden ser únicamente epiteliales como *Ezr* (Richter, Wittler, y Kessel, 2004), en mesénquima como *Barx1* (Haworth et al., 2007), o solo mesénquima como *Acvr2* (Stern et al., 1995), (Figura 1-6). De igual manera sucede, que en algunos casos esté expresándose en el mesénquima, pero para el siguiente estadio se presente en el epitelio, como es el caso de *Elf2*, del que se han encontrado transcritos en el mesénquima facial entre HH16 – HH24 y en epitelio de la zona ventral de PMx,

PMd, AB2 (Geisha, 2014). En resumen, la expresión génica en las diferentes etapas del desarrollo y en las estructuras predecesoras de la cara, son muy variables (Tabla 1-2, 1-3) y aún se desconocen los patrones de expresión de muchos genes más.

Tabla 1-2. Patrones de expresión génica durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo (*Gallus gallus*) en estadio HH14. Expresión de genes representativos de vías de señalización distribuidos según el estadio de desarrollo. Se describe: la zona ventral (Zv) y la zona caudal (Zc); de los (AB) Arcos braquiales de 1 y 2 y se distingue el epitelio (Ep), el mesénquima (M) y la zona ventral (Zv); y por último las Hendiduras (H) de 1 y 2

Gen	Estructuras anatómicas									Referencia
	PFN	AB1			AB2			H1	H2	
		Ep	M	Zv	Ep	M	Zv			
Bmp7	-	+	-	+	+	-	+	+	+	(Bothe, Tenin, Oseni, y Dietrich, 2011)
Cbfb	+	-	-	+	-	-	+	-	-	(Bollerot, Romero, Dunon, y Jaffredo, 2005)
Frzb	+	-	-	+	-	-	+	-	-	(Ladher et al., 2000)
Gfra2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	(Homma, Oppenheim, Yaginuma, y Kimura, 2000)
Has2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(Klewer et al., 2006)

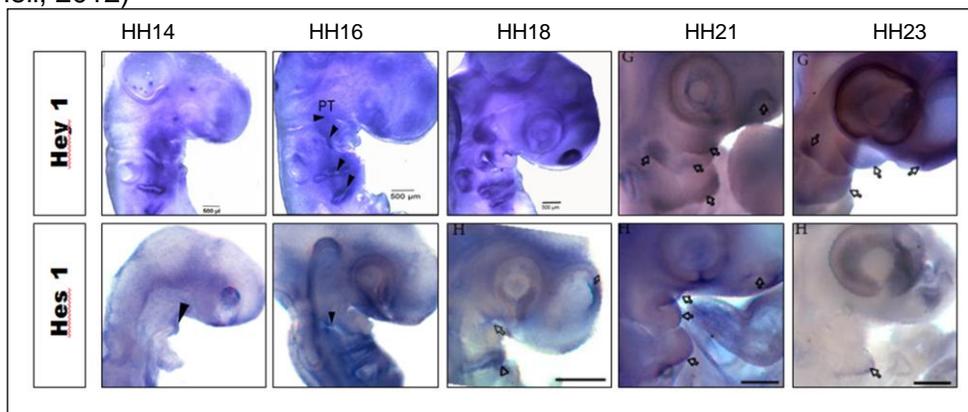
El desarrollo de la prominencia frontonasal está regulado por un grupo de señales provenientes de dos centros de señalización localizados en el epitelio nasal (EN) y la zona ectodermal frontonasal (FEZ) (Hu, Marcucio, y Helms, 2003). Es en estos centros de señalización donde se concentra la secreción de varias moléculas como FGF8, BMP y SHH, involucradas en mediar procesos de proliferación y apoptosis del mesénquima nasal (Foppiano, Hu, y Marcucio, 2007).

En un estudio previo realizado en la línea de investigación de crecimiento y desarrollo craneofacial de la maestría de odontología de la Universidad Nacional, se probó que *Notch1*, *Serrate2* y *Hey1* se expresan simultáneamente en el epitelio nasal desde HH19 hasta HH25, exceptuando *Serrate2* en este último estadio de desarrollo. La expresión de los marcadores evaluados en estas etapas de desarrollo se correlacionan con procesos de diferenciación de células del epitelio nasal y con el papel del epitelio nasal en el desarrollo del mesénquima nasal lateral, con lo que se puede presumir que la vía Notch a través de la interacción entre el receptor Notch1 y el ligando Serrate2 activan la transcripción de *Hey1* en el epitelio nasal dónde puede tener dos posibles roles, uno de participación del nervio olfatorio mediando los procesos de determinación de destino celular de células epiteliales a neuronas olfatorias y células gliales olfatorias y otro de regulación de señales provenientes del epitelio nasal participando indirectamente en el patronamiento de derivados esqueléticos del proceso nasal lateral (Carbonell, 2012) (Figura 1-6).

Tabla 1-3. Patrones de expresión génica durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo (*Gallus gallus*). Expresión de genes representativos de vías de señalización distribuidos según el estadio de desarrollo. Se describen de la (PFN) prominencia frontonasal la zona ventral (zv) y la zona caudal (zc); de los (AB) Arcos braquiales de 1-4 se distinguen el epitelio (E), el mesénquima (M) y la zona ventral (Zv); y por último las Hendiduras (H) de 1 a 4. (nr) no lo refiere el estudio y (n) no están las estructuras en el estadio de desarrollo.

	Gen	Estructuras Anatómicas																		Referencia		
		PFN		AB1			P	P	AB2			AB3			AB4			H1	H2		H3	H4
		ZV	ZC	E	M	Z	Mx	Md	E	M	Zv	Ep	M	Zv	Ep	M	Zv					
HH 16	Acvr2	-	-	-	+	+	n	N	-	+	+	-	+	+	n	n	n	-	-	-	n	(Stern et al., 1995)
	Bmper	-	+	+	-	-	n	N	+	-	-	+	-	-	n	n	n	+	+	+	n	(Kamimura, Matsumoto, Koshiba-Takeuchi, y Ogura, 2004)
	Dusp6	+	+	+	+	+	n	N	+	+	+	+	+	+	n	n	n	+	+	+	n	(Eblaghie et al., 2003)
	Fgf6	-	+	+	+	+	n	N	+	+	+	+	+	+	n	n	n	+	+	+	n	(Kumar y Chapman, 2012)
	FoxG1	+	-	-	-	-	n	N	nr	nr	nr	nr	nr	nr	n	n	n	nr	nr	nr	n	(Pauley, Lai, y Fritzscht, 2006)
HH 18	Bmi1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	¿	¿	¿	¿	(Fraser y Sauka-Spengler, 2004)
	Barx1	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	-	-	nr	nr	(Shigetani, Nobusada, y Kuratani, 2000)
	Bmp4	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nr	nr	(Shigetani et al., 2000)
	Cldn1	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	(Simard, Di Pietro, y Ryan, 2005)
	Ctnnb1	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	(Geetha-Loganathan et al., 2009)
	Emx1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(Bell, Ensini, Gulisano, y Lumsden, 2001)
	Dkk	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	nr	nr	nr	-	-	-	-	(Geetha-Loganathan et al., 2009)
	Dlx1	nr	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	(Shigetani et al., 2000)
	Fgf3	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	(Kumar y Chapman, 2012)
	FoxE1	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Yaklichkin SY et al, 2011
Gdnf	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(Homma et al., 2000)	
GT 19	Barx1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nr	nr	(Haworth et al., 2007)	
	Efnb2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	(Peters y Cepko, 2002)	
	Ezr	nr	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	(Richter et al., 2004)	
	Fgf19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(Gimeno y Martinez, 2007)

Figura 1-6. Expresión génica de los genes *Hey1* y *Hes1*. Patrones de expresión de genes diana de la vía notch en estadios de desarrollo de pollo desde HH14 hasta HH223. Tomado de (Bayona, 2012; Carbonell, 2012)



Por otro lado, se detectaron transcritos de *Notch1* y *Hey1* en el epitelio frontonasal durante el estadio de desarrollo HH21, etapa en la que se establece la FEZ en los pollos. Este centro de señalización es conservado entre aves y mamíferos y está involucrado en controlar la polaridad dorso-ventral y la extensión próximo-distal frontonasal (Hu et al., 2003). Los resultados obtenidos, permiten sugerir que *Notch1* y *Hey1* participan durante el establecimiento de la FEZ. Dada la ausencia de expresión del gen *Serrate2* en este centro de señalización, se sugiere la posible participación de otros ligandos componentes de la vía Notch no evaluados.

En resumen, las diferentes etapas del desarrollo implican complejas interacciones moleculares que se dan en la célula, que permitirán la comunicación entre células vecinas para llevar señales al interior del núcleo y activar la transcripción de genes específicos en un momento determinado y en un tejido específico. Dichas interacciones se dan por la activación de diferentes vías de señalización que actúan por sí solas o por interacción con otras vías.

1.2 Vía de señalización Notch

La vía de señalización Notch ha sido asociada con el desarrollo de varios órganos. Dexter y colaboradores, en 1914 descubrieron la aparición de surcos (*notches*) en los bordes de las alas de la *Drosophila melanogaster* también conocida como mosca de la fruta y lo asociaron con la mutación del gen Notch. En 1917, el Dr. Thomas Hunt Morgan describió la vía Notch, por primera vez, y la asoció con la neurogénesis y la especificación del ectodermo en la *Drosophila melanogaster*. En 1919 Mohr y colaboradores detectaron una deficiencia funcional de la proteína Notch, en 1940 Poulson demostró que la pérdida del gen es letal en embriones. Posteriormente, en 1970, Wright encontró que las mutaciones del gen Notch-1 inducen la formación de una estirpe neurogénica en células que estaban destinadas a ser epidérmicas (D'Souza, Meloty-Kapella, y Weinmaster, 2010). A mediados de los años ochenta, los grupos de Artavanis-Tsakonas y Young clonaron y expresaron independientemente el gen que traduce para una proteína transmembranal (Leticia, Maria, y Erika, 2006). A la fecha, se han identificado varios genes del receptor Notch en diversas especies, en humanos se

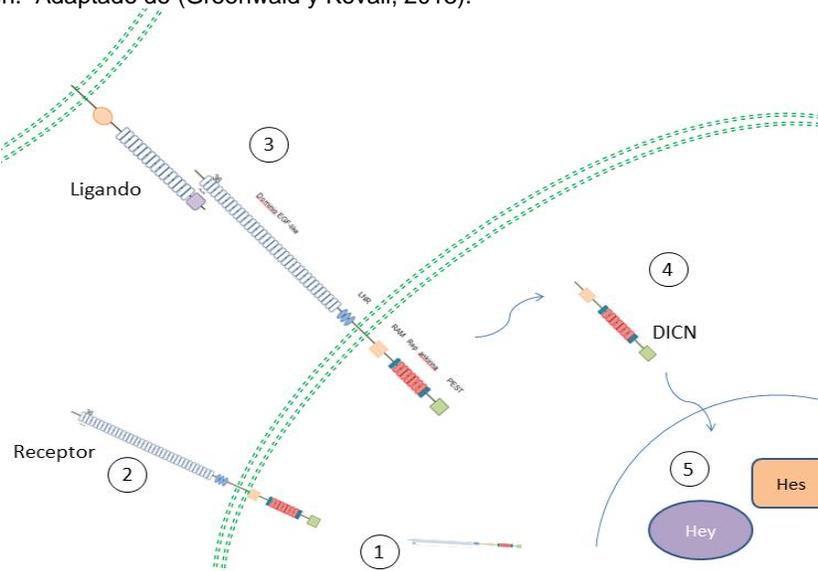
conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4 (Artavanis-Tsakonas, Rand, y Lake, 1999).

Los genes Notch poseen una estructura altamente conservada que codifica receptores transmembranales de aproximadamente 300 kilodaltones (kDa). El producto de cada gen es un solo polipéptido precursor que es procesado proteolíticamente por una convertasa en el aparato de Golgi, dando lugar a un heterodimero de tres dominios, que irá a anclarse a la membrana: uno extracelular (Notch *Extracelular Domain*, NECD), el transmembranal (Notch *transmembrane Domain*, NTMD) y uno intra celular. La región EC contiene varias repeticiones en su secuencia de aminoácidos, similares a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), en donde las repeticiones 11 y 12 son el principal sitio de unión a su ligando proveniente de otra célula (Greenwald y Kovall, 2013).

Una vez el NECD se une con su ligando que se encuentra usualmente anclado a la membrana de una célula vecina, es procesado proteolíticamente, generando que el dominio intracelular (Notch Intracellular Domain NICD) se transloque al núcleo e interactúe con factores de transcripción de la familia CLS (CBF-1/ Lag-1/ Suppressor of HairlessSuH) a través del dominio RAM23 de IC (McGill y McGlade, 2003). Al unirse CBF-1 a ICD se disocia un complejo represor que incluye una diacetilasa de histonas (HDAC-1) y recluta coactivadores nucleares como Mastermind (MAML1) y SKIP, lo que hace a CBF-1 cumplir su rol como un activador de la transcripción (Kovall, 2007).

Los cuatro receptores Notch tienen estructuras muy similares entre sí, con diferencias esenciales en NECD Y NICD. Los receptores Notch1 y Notch2 contienen 36 repeticiones "EGF-like" en sus dominios EC, mientras que Notch3 contiene 34 y Notch4 solamente 29. A nivel del dominio IC tienen las siguientes diferencias: Notch-1 contiene un fuerte dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés), mientras que en Notch-2 su TAD es débil y en Notch-3 y -4 no está presente.

Figura 1-7. Vía de señalización Notch. 1) Termina la formación de Notch en el aparato de Golgi. 2) La célula A expresa el receptor, una proteína trasmembranal de tres dominios. 3) Una célula B expresa el ligando que activa al receptor. 4) Un clivaje permite que el dominio intracelular de Notch (DICN) circule en el citosol 5) DICN se trasloca al núcleo y se acopla con los genes diana de la familia Hey o Hes, para dar inicio a la transcripción. Adaptado de (Greenwald y Kovall, 2013).



Los ligandos del receptor Notch en invertebrados son conocidos como Delta y Serrate para *D. melanogaster*, en tanto que para *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) su homólogo se conoce con el nombre de LAG-1. A estos ligandos se les ha llamado colectivamente DSL (Nichols, Miyamoto, y Weinmaster, 2007), que se refiere a las iniciales de Delta-Serrate-Lag. Otros ligandos en *C. elegans* son LAG-2, APX-1, ARG-2 y F16B12.2. En mamíferos se conoce un grupo de homólogos de estos ligandos, los de Delta denominados "Delta-like"; y los de serrate llamados Jagged (Jag). En total se conocen cinco ligandos en mamíferos denominados Jag1, Jag2 y H-Delta-1, -3, y -4 (DII1, DII3, y DII4).

Los ligandos, al igual que los receptores son proteínas transmembranales heterodiméricas, por lo que se requiere que haya una cercanía celular para que se dé la señalización canónica. Aunque se requiere de la comunicación célula a célula se ha encontrado además una forma soluble de Delta en *Drosophila*, lo que sugiere que Notch puede mediar la comunicación entre células no contiguas (Oui et al, 1999).

Las diferencias estructurales en esta familia de ligandos son el número de las repeticiones y la distancia en estas del dominio extracelular y la presencia de un dominio rico en cisteína localizado corriente abajo de las repeticiones EGF, específicamente en los ligandos Jag1 y Jag2. (Miyamoto, Weinmaster, y Editor-in-Chief: Larry, 2009).

Las proteínas moduladoras de la unión receptor-ligando a nivel extracelular son las proteínas "Fringe" en *Drosophila* y sus homólogos en mamíferos, "Lunatic Fringe, Radical Fringe, y Maniac Fringe". Además, se han identificado proteínas que regulan la proteína Notch a nivel intracelular; en *C. elegans* se conocen las proteínas Sel-1 y Sel-10 (Lan et al., 2007), y en *Drosophila*, la proteína Numb que actúa regulando negativamente la señalización al unirse con la región intracelular de Notch. En el desarrollo de algunos órganos se ha descubierto una proteína moduladora de la vía, conocida como mastermind (Mam1) y cumple funciones específicas en la diferenciación y mantenimiento de células en la morfogénesis ocular (Y. Zhang et al., 2013).

En cuanto a los genes diana de Notch se han reconocido factores de transcripción represores pertenecientes a las familias de proteínas HES (*hairly and enhancer of Split*) y HRT/HERP/Hey (familia "*basichelix-loop-helix-Orange*"), IL-4, p21, etcétera. Sin embargo, aún no es claro cuál o cuáles son responsables de los efectos fenotípicos de la señal Notch (D'Souza et al., 2010). Algunos ejemplos de la participación de Notch es la inhibición del desarrollo neuronal, ya que parece ser que los genes blanco Hes1 y Hes5 median muchos o quizás todos los efectos producidos por Notch. En el caso del desarrollo del páncreas el blanco de Notch es el gen HES-1, en el desarrollo cardiaco el gen Hey2, y en el desarrollo vascular los genes Hey1 y Hey2. Notch ejerce, además, un doble papel en un modelo de cultivo celular (3T3-L1): la activación de HES-1 induce adipogénesis, mientras que al bloquear la activación de HES-1 se inhibe la diferenciación de 3T3-L1. Por último, se ha informado que el gen IL-4 es un blanco directo de Notch y explica la capacidad que tiene de promover el fenotipo Th2 de las células T de ayuda (Fiuza y Arias, 2007).

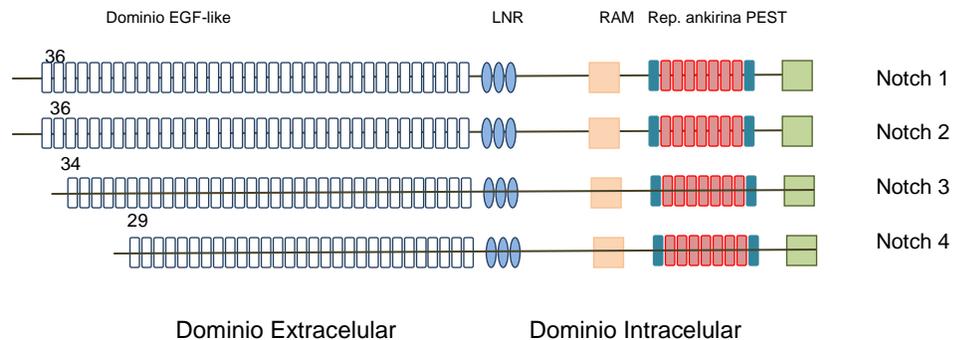
La vía ha sido asociada con múltiples anomalías del desarrollo e incluso cáncer, en donde la alteración de alguno de los componentes de la vía, o de moléculas que interactúan con esta, desencadenan una alteración en el destino celular o en la proliferación, generando desordenes severos (Hori, Sen, y Artavanis-Tsakonas, 2013).

1.2.1 Notch2

El receptor Notch2 es una proteína transmembranal que pertenece a una familia de 4 receptores identificados en humanos con sus correspondientes homólogos en otras especies, particularmente dos, Notch1 y Notch2, en pollos. Notch2 tiene características muy similares en su conformación con respecto al receptor Notch1, poseen sus tres dominios, las repeticiones de ankirina, las regiones ricas en cisteína, y 36 repeticiones de secuencias de aminoácidos similares al factor de crecimiento epidermal EGF-Like (Lindsell, Boulter, diSibio, Gossler, y Weinmaster, 2013), en contraste con los receptores Notch3 y Notch4 que tienen menos repeticiones de EGF (Figura 1-8)

Se han planteado como principales diferencias entre Notch1 y Notch2, los aminoácidos constitutivos del dominio intracelular ICD, (Kraman y McCright, 2005) a partir de lo cual se generó la hipótesis en la que se atribuye a esta diferencia el cambio funcional de una proteína a otra.

Figura 1-8. Receptores Notch. Son proteínas transmembranales multidominio, Notch 1 – 4 que tienen conformaciones similares, en el dominio extracelular se diferencia por el número de EGF-like; en el dominio intracelular las repeticiones de ankirina, RAM y PEST.



En otro trabajo encontraron que existe una diversidad funcional entre los receptores Notch, en donde usaron tres formas truncadas de Notch1, Notch2 y Notch3, y monitorearon su actividad transcripcional con los niveles de Hes1 y Hes5 (Shimizu et al., 2002). También se comprobó que la estructura del complejo CSL genera diferencias en la señalización mediada por Notch1 y Notch2, afectando significativamente su capacidad de transcripción (Yuan, Friedmann, VanderWielen, Collins, y Kovall, 2012).

Estructuralmente la repetición 8 de EGF en ECD de Notch2 tiene una importancia esencial en la selectividad del ligando, dado que tiene la capacidad específica de discriminar entre los ligandos Serrate y Delta (Yamamoto et al., 2012).

Algunos investigadores han observado diferencias en el C-terminal, siendo debatido por otros grupos que lo han evaluado intercambiándolos de un receptor a otro, sin encontrar diferencias en la transcripción. Lo anteriormente expuesto, apoya la idea del modelo de señalización donde los ICDs de Notch1 y Notch2 son funcionalmente redundantes y su activación depende de la activación diferencial de sus ligandos. De igual manera, si tanto Notch1 como Notch2 generan el mismo efecto corriente abajo, indicaría que se pueden intercambiar en escenarios donde el objetivo sea activar exógenamente la vía de señalización con el propósito de controlar el destino celular (Kraman y McCright, 2005).

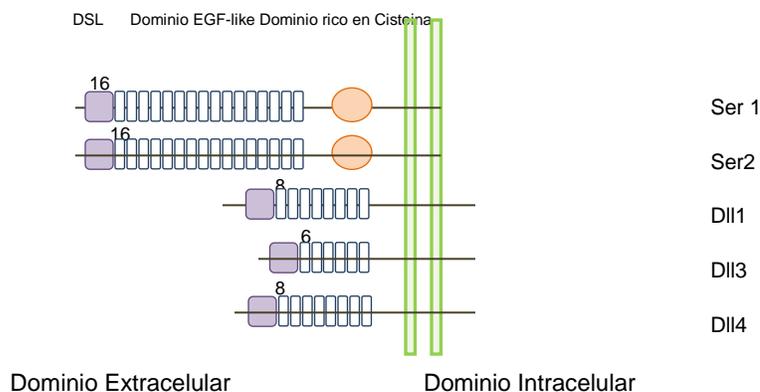
La señalización a través de Notch2 tiene gran importancia en la decisión de destinos celulares en diferentes tejidos durante la organogénesis tanto en las células embrionarias como en las pluripotenciales inducidas (Jeliazkova et al., 2013). En un trabajo realizado in vivo, se encontraron dos nuevos linajes en tejidos epiteliales mamarios asociados a la expresión de Notch2 (Sale, Lafkas, y Artavanis-Tsakonas, 2013), en otro estudio, identificaron el papel que juega en el desarrollo placentario en trofoblastos, y con expresión complementaria con algunos de sus ligandos en el cono ectoplacentario (Gasperowicz, Rai, y Cross, 2013), y también se ha reconocido su papel en los hepatoblastos embrionarios (Jeliazkova et al., 2013), como ejemplo de la determinación de destinos celulares de diferentes tipos celulares en los que se encuentra implicado.

Otros estudios realizados en pollo y ratón han evidenciado la función de Notch2 en diferentes estadios del desarrollo óptico que implican la activación de la señalización Notch en diferentes tejidos (Zhu, Gasperowicz, y Chow, 2013). También se ha identificado la función reguladora de Notch2 en la vía de señalización de BMP y la morfogénesis epitelial del cuerpo ciliar del ojo, responsables de la secreción del humor acuoso y el mantenimiento de la presión intraocular (Zhou et al., 2013).

1.2.2 Serrate1

Al igual que los receptores, estructuralmente, los ligandos DSL son proteínas transmembrales que atraviesan la membrana en un único paso, que tienen similitud en sus dominios extracelulares, dado que también tienen múltiples repeticiones de EGF-like. Específicamente, Ser1 cuenta con 16 repeticiones al igual que Ser2 (Figura 1-9), y cada una está compuesta por 40 aminoácidos, que incluyen 6 cisteínas que se presume forman los puentes disulfuro.

Figura 1-9. Ligandos de la vía Notch. Los dominios ricos en cisteína, característicos de los ligandos Serrate1 (Ser1) y Serrate2 (Ser2). Los ligandos Delta1 (Dll1), Delta3 (Dll3) y Delta4 (Dll4) difieren en su dominio extracelular por el número de dominios de EGF – like.



La secuencia primaria de estos motivos, sugiere que muchos de estos dominios EGF-like tienen capacidad de adherir calcio, lo cual puede afectar tanto la unión de proteínas como la señalización (Cordle et al., 2008).

Todos los ligandos, tanto Delta como Serrate están definidos por un dominio común en el N-terminal que se denomina dominio DSL, que en conjunto con las repeticiones de EGF-like, colabora con la unión y activación del receptor Notch, lo que lo hace necesario para la señalización (Shimizu et al., 1999). A diferencia de los receptores, los ligandos canónicos tienen un C-terminal citoplasmático muy corto continuo al dominio transmembranal. Estas secuencias IC no están muy conservadas de especie a especie, pero contienen múltiples lisinas que pueden ser monoubiquitinadas para regular el tráfico intracelular de proteínas. La mayoría de los ligandos en su C-terminal contienen dominios putativos PDZ que pueden mediar interacciones de proteínas intracelulares (Wang, 2011).

Serrate a diferencia de los ligandos delta, cuenta con un dominio rico en cisteína. Por otra parte, se han identificado homólogos en otras especies que son denominados Jagged, Jag1 y Jag2.

También se ha comprobado que la señalización jagged1-notch regula la decisión de múltiples destinos celulares así como la diferenciación en el sistema respiratorio, mantiene el desarrollo pulmonar y el balance de células de vías aéreas (Zhang, Loch, Radtke, Egan, y Xu, 2013). En estudios previos, se identificó la importancia de la vía notch en la morfogénesis de la tiroides y más recientemente se comprobó que Jagged1 participa en la determinación del destino celular de células del sistema endocrino de peces cebra (Porazzi et al., 2012), también se requiere en las fases de desarrollo tempranas de la tiroides y su función. También se ha comprobado que la señalización célula-célula a través de Jagged1-Notch2 participa en el desarrollo temprano de los ovarios (Dorfman et al., 2011).

Ser1 ha sido bastante estudiado en el desarrollo de oído, donde se expresa en etapas tempranas del desarrollo de las placas prosensoriales en las que puede iniciar la activación de la vía (Daudet, Ariza-McNaughton, y Lewis, 2007). Además, puede conducir la expresión de Sox2 y Bmp4, e incluso la expresión de sí mismo; esta autoregulación positiva es la que mantiene la vía activada (Neves et al, 2011; Kamaid et al, 2006)

Las investigaciones muestran que la reducción de la función de *Jag1b* o *Notch2* rescata parcialmente los defectos ventrales de *Edn1* mutantes, lo que indica que *Edn1* promueve el desarrollo del esqueleto facial, en parte, mediante la inhibición de la señalización de *Notch-Jagged* en los precursores esqueléticos ventrales. En conjunto, estos resultados indican una nueva función de la señalización *Jagged-Notch* para garantizar la identidad dorsal dentro del gran campo de los precursores del esqueleto facial (Francis-West, Ladher, Barlow, y Graveson, 1998; Kuratani, 2005; Zuniga, Stellabotte, y Crump, 2010)

1.2.3 Delta1

El ligando Delta, también conocido como Dll1, pertenece a la familia de ligandos de la vía canónica Notch, en los que se han reconocido hasta tres homólogos en humanos (Dll1, Dll3 y Dll4) y particularmente en pollos Dll1 y Dll 4. También se ha identificado un ligando delta no canónico delta-like (Dlk).

Como se había referenciado anteriormente, la señalización a través de uno u otro ligando puede generar diferentes respuestas celulares, incluso la respuesta puede ser contraria, quienes reportaron que la expresión de Delta1 promueve la osteoclastogénesis vía Notch2, mientras que Jagged1 suprime la osteoclastogénesis a través de Notch1 (Sekine et al., 2012).

En cultivos in vitro, se demostró que los ligandos Delta1 y Jagged1 transmiten diferentes señales a los progenitores de células T, en donde se comprobó además que la expresión tanto de Delta1 como jagged1 en células estromales OP9 inhibe la diferenciación de timocitos en un linaje de células –B, pero solo la expresión de dll1 en células estromales promueve la diferenciación y maduración de progenitores de células –T (Lehar, Dooley, Farr, y Bevan, 2005).

Desde hace un par de décadas se logró identificar el papel de la vía Notch en el desarrollo de las alas de pollo, y se estableció la importancia que desempeña cada uno de los diferentes componentes, particularmente se ha profundizado en la expresión de *Ser2* y *Delta1* en el estadio 26 durante la miogénesis, aunque tan solo *Ser2* participa en la maduración del músculo, y más adelante se expresa en la zona interdigital *Notch1* y *Ser1* (Vargesson, Patel, Lewis, y Tickle, 1998).

La formación axial es un proceso fundamental del desarrollo embrionario temprano. Además de los ejes anteroposterior y dorsoventral, la determinación del eje izquierda-derecha es crucial para la morfogénesis adecuada de los órganos internos y es evolutivamente conservado en vertebrados. Se ha demostrado que la señalización de Notch se requiere para la determinación normal de izquierda a derecha en el ratón. La pérdida de función de Delta1 causa fenotipos ambiguos, incluyendo la asignación al azar de la dirección de giro del embrión y el bucle del corazón. La causa más probable se atribuye al fracaso en el desarrollo de las estructuras de la línea media adecuadamente, que se originan desde el nodo, interrumpido y deformado en los embriones mutantes Delta1 (Przemeck, Heinzmann, Beckers, y Hrabe de Angelis, 2003).

A pesar que en otros trabajos no se han reportado patrones de expresión de Delta1 ni en arcos branquiales ni prominencias faciales en los estadios de desarrollo craneofacial, es importante tener los patrones en conjunto con el resto de genes de la vía para establecer su mecanismo y funcionamiento.

1.3 Desordenes craneofaciales asociados a la Vía de señalización Notch

Las anomalías branquiales comprenden aproximadamente entre el 17% y el 20% de los desórdenes pediátricos congénitos de cara y cuello, y sus características son muy variables, por lo que los protocolos de manejo y tratamiento son bastante extensos, dependiendo sobre todo del tipo de anomalía, ya sea un quiste, un tracto sinusal o una fístula (Goff, Allred, y Glade, 2012; Thakur, Shekar, Saluja, y Mohindroo, 2013). Esto ha generado dificultades en el diagnóstico correcto de la lesión, que puede llegar a tener menos de la mitad de efectividad, es el caso de lo reportado en un estudio retrospectivo en Malasia, donde tan solo en el 41,6%, de los casos fue un diagnóstico acertado (Zaifullah, Yunus, y See, 2013), y en otro estudio alcanzó hasta el 80% el buen diagnóstico (Kenealy, Torsiglieri, y Tom, 1990).

Las anomalías branquiales son entidades que se presentan característicamente por lesiones ubicadas con mayor frecuencia en lado del cuello, entre un 97% - 98% de los casos es unilateral y en menor frecuencia se presenta bilateralmente (1%-2%). También se ha reportado en casos extremadamente extraños que se presenten asociadas conjuntamente con anomalías entre AB1 y AB2, y están relacionadas con enfermedades congénitas (Thakur et al., 2013). El tratamiento generalmente es quirúrgico, ya sea para el quiste o para la fístula y una de sus complicaciones está dada por la infección que se presenta en el tracto. También pueden comprometerse quirúrgicamente otros tejidos, por ejemplo en la anomalía derivada de AB2, se considera realizar la tonsilectomía (Cheng y Elden, 2012), y en otros casos derivados de AB1 se puede comprometer el nervio facial (Joice, Sudarshan, y Hussain, 2012).

Una de las anomalías en las que la vía de señalización Notch juega un rol muy importante por la participación de uno o más de sus componentes, es el síndrome de Alagille (McDaniell et al., 2006). Diversos estudios confirman la implicación de Jagged1 hasta en un 94% de los casos estudiados y de Notch2 en casi un 1% (Kamath et al., 2011). El síndrome de Alagille es un desorden del desarrollo que se caracteriza por presentar anomalías craneofaciales, renales, hepáticas, oculares y esqueléticas principalmente (McDaniell et al., 2006).

Se ha encontrado que la delección de jagged1 durante el desarrollo temprano en células de la cresta neural causa hipoplasia del tercio medio facial y muerte en el día 30 posnatal debido a su incapacidad de masticar por la maloclusión y las malposiciones dentales severas. Este fenotipo se debe a la reducción de la proliferación celular, vasculogénesis aberrante con disminución de vasos productivos y reducción de la matriz extracelular (Humphreys et al., 2012).

Varios autores encontraron relación entre Notch2 y el síndrome de Hadju-Cheney (Gu et al., 2013; Simpson et al., 2011), también con otros raros desórdenes de osteoporosis en los que hallaron mutaciones truncadas de la proteína (Isidor, Lindenbaum, et al., 2011). De igual forma, el síndrome renal poliquistico con peroné serpenteante, que para algunos investigadores es la misma entidad clínica del Hadju-Cheney pero con diferentes grados de expresión (Narumi et al., 2013), y para otros es una entidad diferente; se comprobó que también está causado por una mutación en Notch2 (Isidor, Le Merrer, et al., 2011), y tanto el uno como el otro presentan características fenotípicas similares, cambios

musculo esqueléticos, alteraciones del desarrollo a nivel del complejo craneofacial, corta estatura y desórdenes en órganos asociados. De las características fenotípicas craneofaciales, se han descrito frecuentemente la dolicocefalia, protuberancia de la porción escamosa del hueso occipital (Batrocefalia), múltiples huesos wormianos, suturas craneales abiertas, silla turca anómala con una marcada depresión del tubérculo, presencia de pequeños huesos faciales y maloclusión dental asociada a malposiciones dentales, ausencia del seno frontal o hipoplásico, micrognatismo y ángulo mandibular obtuso. En los hallazgos orales se cuenta la pérdida prematura dental debido a la marcada reabsorción del hueso alveolar (Currarino, 2009).

Por otra parte, los ratones homocigotos con mutación negativa de Hes1 específica en CCN, presentan fenotipos con anomalías craneofaciales severas, entre las que se evidencia la ausencia de la formación de la calvaria, incluyendo los huesos, las meninges y la duramadre, también se observan defectos de base de cráneo, maxilares y mandíbula de menor tamaño, y un desarrollo evidentemente anormal de lengua y paladar (Akimoto et al., 2010). Los autores presumen que las anomalías obedecen a defectos en el desarrollo de las células de la cresta neural, y suponen que Hes1 participa en la regulación del desarrollo de varias estructuras craneofaciales derivadas de las CCN (Levi, Brugmann, y Longaker, 2010), y aún no se tiene claridad acerca de la función celular que se encuentra afectada.

Las mutaciones de Notch1/delta-like3 (Dll3) pueden causar interrupciones en el patronamiento axial segmental. En una prueba realizada en ratones doble mutantes heterocigotos, presentaron anomalías segmentales similares a los defectos vertebrales congénitos observados en humanos. De igual forma, presentan una reducción estadísticamente significativa del tamaño de la mandíbula y en el tamaño del paladar óseo (Loomes et al., 2007).

Jiang y colaboradores (1998) examinaron el rol de Jagged 2 in vivo mediante una mutación localizada que remueve un dominio específico que requiere la proteína para poder interactuar con el ligando. Los ratones homocigotos obtenidos con esta delección sufrieron muerte perinatal debido a los defectos en la morfogénesis craneofacial, en los cuales se destaca la hendidura palatina y la fusión de la lengua con los procesos maxilares (Jiang et al., 1998). En trabajos posteriores, se demostró que jagged2 se expresa a través del epitelio oral y se requiere para la activación de Notch1 durante la diferenciación del epitelio oral, quien durante esta fase se expresa altamente en las células del periderma de lengua y procesos maxilares (Casey et al., 2006). Más recientemente, se comprobó una convergencia molecular en las vías de Jagged2 y IRF6, que tienen gran importancia en el proceso de diferenciación del epitelial oral, esenciales para el control de la adhesión y fusión palatina (Richardson, Dixon, Jiang, y Dixon, 2009). Estos datos en conjunto sugieren que la señalización Jagged2-Notch1 está regulada espacio-temporalmente durante el desarrollo palatino y previene la adhesión prematura de los procesos palatinos con otras estructuras orales (Casey et al., 2006).

Por otra parte, una mutación de Notch3 lleva a la sobre expresión de la proteína y está asociada con la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infarto subcortical y

leucoencefalopatía (CADASIL), que lleva a una acumulación de NOTCH3 y una degeneración selectiva del músculo liso arterial (Monet-Lepretre et al., 2009), proponiendo que su acción se da en la medida que bloquea la vía canónica de los otros receptores, Notch1 - Notch4 (Meng et al., 2012).

A nivel craneofacial existen reportes de la vía notch asociada a oncogénesis y específicamente se comprobó la implicación de los ligandos Notch con diferentes tumores, algunos vinculados al desarrollo dental o a los maxilares (Meliou, Kerezoudis, Tosios, Lafkas, y Kiaris, 2011). Numerosos estudios comprueban que Jagged1 y Delta1 tienen propiedades funcionales distintas (Urs et al., 2008), manifestadas en cambios en la fisiopatología del tumor, cinética, vascularización, número y tamaño de focos necróticos, y la invasividad.

Notch también se asocia con entidades neoplásicas como por ejemplo en el ameloblastoma plexiforme y ameloblastoma folicular donde controla la citodiferenciación y proliferación (Kumamoto y Ohki, 2008) y más recientemente se mostró que los receptores notch y sus ligandos tienen un rol importante durante el desarrollo del ameloblastoma desmoplásico (Siar, Nakano, Han, et al., 2010), donde Jagged1 es el protagonista principal en la adquisición de las características tejido-específicas de este tumor.

Se ha sugerido que diferentes genes de la vía Notch participan en la citodiferenciación del tumor escamoso odontogénico, que es un raro neoplasma epitelial odontogénico benigno en el que se evaluó mediante inmunohistoquímica, la reactividad positiva variable en las células neoplásicas epiteliales para los receptores Notch1, Notch3 y Notch4 y sus ligandos jagged1 y Delta1 (Siar, Nakano, Ng, et al., 2010).

2. Patrones de Expresión de los genes *Notch2*, *Delta1* y *Ser1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales de embriones de pollo

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Embriones de pollo.

Los embriones de pollo (*Gallus gallus*) se obtuvieron de huevos fertilizados suministrados por una Granja avícola tecnificada ubicada en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca). Se utilizó el mismo distribuidor de previas investigaciones con quien ya se han tenido resultados óptimos en la obtención de huevos embrionados. Una vez entregados por la granja, se transportaron hasta el laboratorio en condiciones de temperatura y humedad controladas.

Los huevos fueron incubados en el *Precision Sci Incubator*, del laboratorio del Instituto de Genética. Se programó a una temperatura entre 37.5 y 38.5⁰C en un ambiente húmedo (70%-80%). Para obtener los embriones en estadios seleccionados, se siguieron los protocolos de trabajos anteriores realizados en esta institución en el mismo modelo (Arboleda y Hurtado, 2009). El reconocimiento del estadio se realizó por observación en estereoscopio NIKON SMZ1 con lente 2x, basados en las características morfológicas embrionarias descritas (Hamburger y Hamilton, 1992), de ultrasonido (Schellpfeffer, Bolender, y Kolesari, 2007), el conteo de las somitas. Una vez se identificó el estadio de interés, los embriones fueron disecados en solución buffer fosfato (PBS) y fijados en paraformaldehído (PFA 4%) entre 4 y 12 horas según el estadio.

2.1.2. Síntesis de sondas

Los plásmidos que contienen las secuencias molde para la síntesis de las sondas de interés fueron generosamente donados por los Doctores Fernando Giraldez del Grupo de Biología del Desarrollo de la Universitat Pompeu Fabra-Parc de Recerca Biomèdica de

Barcelona, España; y Domingos Henrique del Instituto de Medicina Molecular de Lisboa, Portugal. Se amplificaron usando bacterias E.Coli Top10.

Una vez amplificados los plásmidos, se purificaron extrayendo el DNA plasmídico de bacterias Top10 transformadas con el Kit *QIAprep Miniprep Handbook* y siguiendo el protocolo recomendado por la casa fabricante Qiagen®. A través del proceso de transcripción *In vitro* se obtuvieron sondas antisentido de RNA marcadas con digoxigenina de los genes de interés a partir del DNA purificado y linearizado, para lo cual se utilizó RNA polimerasa tipo T3/T7.

2.1.4. Hibridación *In situ* en embrión completo

Para detectar la expresión de los genes se realizó hibridación *in situ* (HIS) en embriones completos (*Whole Mount*), la cual consiste en la detección del RNA mensajero (mRNA) de los genes de interés. Para ello se utilizaron sondas de RNA específicas para cada gen. Después de marcados los nucleótidos con digoxigenina UTP (DIG), como método de visualización se usó un anticuerpo de unión a DIG (anti-DIG) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, que fue revelado con NBT/BCIP (Anexo A)

Esta técnica se aplicó a embriones completos utilizando protocolos estándar de *whole mount* (Acloque, Wilkinson, Nieto, y Dr. Marianne, 2008). Una vez procesados los embriones completos fueron fotografiados y analizados.

2.1.5. Hibridación en cortes histológicos

Además, otros embriones en 3 réplicas por estadio fueron incluidos en parafina para cortes tanto sagitales como coronales; se seccionaron con un espesor de 6 μm en el micrótopo del laboratorio de patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. A las muestras se les aplicó la técnica de hibridación *in situ* sobre cortes (Anexo B)

Los resultados tanto en embriones completos como cortes fueron analizados en el equipo de estereomicroscopia, marca Kaika® Axio Zoom, de la maestría de odontología y ubicado en el laboratorio 1 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, en el que se hizo registro fotográfico a cada una de las réplicas para ser archivadas debidamente, luego se seleccionaron consensualmente por el grupo de investigación, las que se consideraron aptas para publicación.

Los paneles de resultados fueron construidos en programa de diseño gráfico Adobe Acrobat® y se presentan fotos de embriones *whole mount* en la misma magnificación para cada estadio, y las fotos de los cortes presentados fueron las obtenidas en la Hibridación *In Situ* sobre cortes.

2.2. Resultados

2.2.1 Controles positivos.

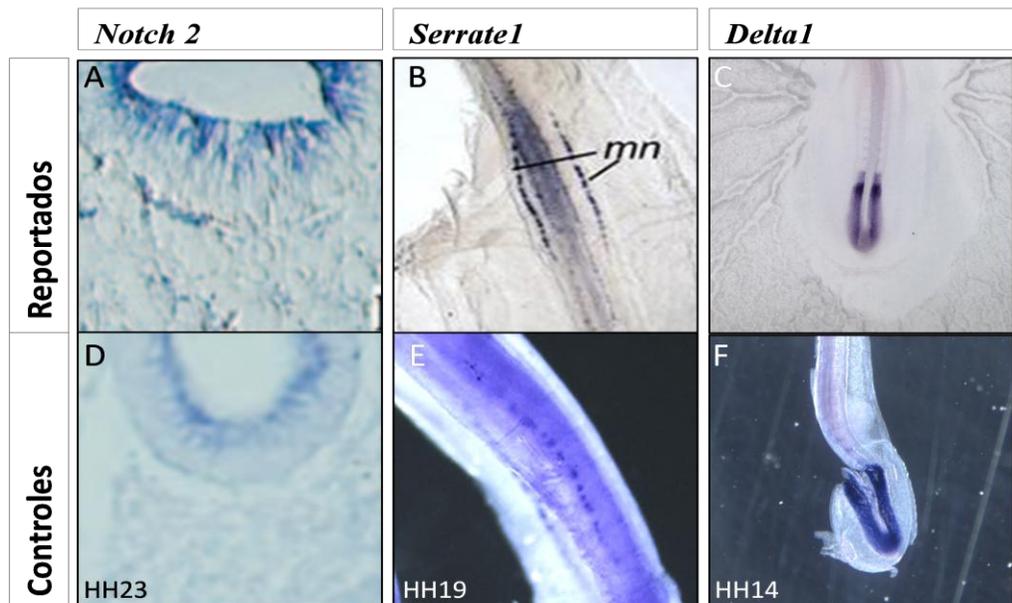
Los controles positivos que se utilizaron para confirmar que las ribosondas sintetizadas detectaron correctamente el *mRNA* de interés, se fundamentaron en descripciones de reportes anteriores de expresión de los genes *Notch2*, *Serrate1* y *Delta1* en los que también se realizó hibridación in situ, durante la embriogénesis del pollo.

El gen *Notch2* en el estadio HH 14 se expresa en la zona de plácoda nasal; en los estadios HH 16 y HH 18 se expresa en retina y en HH 21 y HH 23, en somitas y ala. (Mitsiadis, Romeas, Lendahl, Sharpe, y Farges, 2003; Sato et al., 2008; Solecki, Liu, Tomoda, Fang, y Hatten, 2001)

Para los controles positivos de *Ser1* se verificó la expresión en los mesonefros (Fig. 2-1, B,E) en los estadios HH16 y HH19 (Matsuda et al., 2005) y en plácoda ótica y ojo en los estadios en HH21 y HH23 (Myat, Henrique, Ish-Horowicz, y Lewis, 1996; Vargesson et al., 1998).

En cuanto a *Delta1*, en varias investigaciones confirmaron la expresión en el mesodermo paraxial (Rodrigues, Santos, y Palmeirim, 2006) en estadios iniciales del desarrollo, el cual se utilizó como control en HH14 (Fig. 2-1, C, F). Otros reportes indican expresión en HH 19 y HH21 en tubo neural y en HH 23 en médula espinal (Myat et al., 1996).

Figura 2-1. Controles positivos de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1*. En A, B y C los reportes de expresión con HIS ya publicados; y en D, E y F, obtenidos en presente estudio. Se observa expresión de *Notch 2* en el proventrículo en cortes coronales en estadio HH23 (Matsuda et al., 2005) (A y D). El control de *Serrate1* en los mesonefros en *whole mount* en estadio HH19 (Paxton, Bleyl, Chapman, y Schoenwolf, 2010) (B y E). Los dominios de expresión de *Delta1* se localizan en el mesodermo paraxial, observados en *whole mount* en estadio HH14 (Kiefer y Hauschka, 2001; Rodrigues et al., 2006) (C y F)



2.2.1 Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH14

El estadio HH14 del desarrollo se obtuvo entre las 48 y 50 horas después de la incubación y se caracteriza principalmente por la rotación de la cabeza y su posicionamiento en ángulo de 90° entre el eje del cerebro anterior y posterior, la formación de 22 pares de somitas y el AB1 y AB2 con sus correspondientes hendiduras.

En *whole mount*, la expresión del gen *Notch2* se detecta en la región faríngea aparentemente en la primera hendidura (Figura 2-2B). Específicamente, en los cortes sagitales y coronales, podemos observar que la expresión está circunscrita al endodermo faríngeo de la primera hendidura; en cuanto a *Ser1* tiene una expresión similar a la de *Notch2*, tanto en la primera como en la segunda bolsa (Figura 2-2, C, G y K). *Dll1* al igual que *Notch2* se expresa sólo en el endodermo de la primera bolsa (Figura 2-2 D, H y L).

2.2.2. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH16

Entre 4 y 6 horas posteriores al estadio HH14, se alcanza el estadio HH16 del embrión de pollo, mostrando un número de somitas entre 26 y 28, y una inclinación de la cabeza del embrión entre 60° y 70°, además, inicia la formación de AB3 y AB4 con sus correspondientes hendiduras.

Notch2 presenta expresión en endodermo faríngeo, específicamente en las bolsas faríngeas (Figura 2-3, B), también se observa en el corte (Figura 2-3, F, flechas) expresión en el ectodermo que recubre el primer arco. *Ser1*, mantiene la expresión en la segunda hendidura y además aparece una señal de baja intensidad en el epitelio de la primera hendidura, y una señal franca positiva en tercera y cuarta hendidura (Figura 2-3, C, G y K). Por otra parte, no se detectó expresión del gen *Delta1* en ningún área de la zona faríngea como en el estadio anterior, pero el control positivo si se expresa en la vesícula ótica y la médula espinal (Figura 2 – 3, D, H y L).

Figura 2-2. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH14. (A, B, C y D) Vista lateral de embriones completos. (E, F, G y H) Cortes sagitales. (I, J, K y L) Cortes coronales. Barras de 500µm.

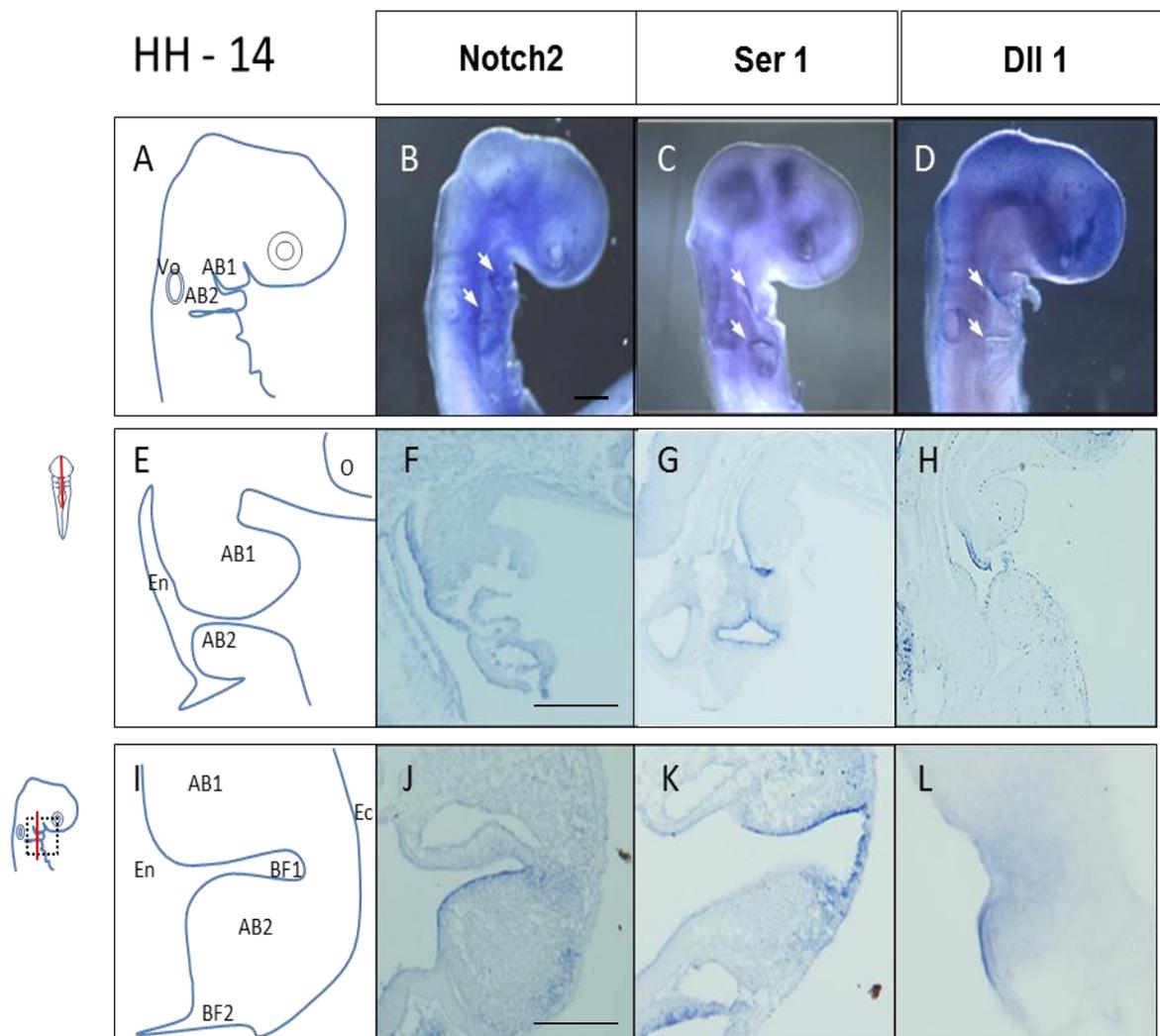
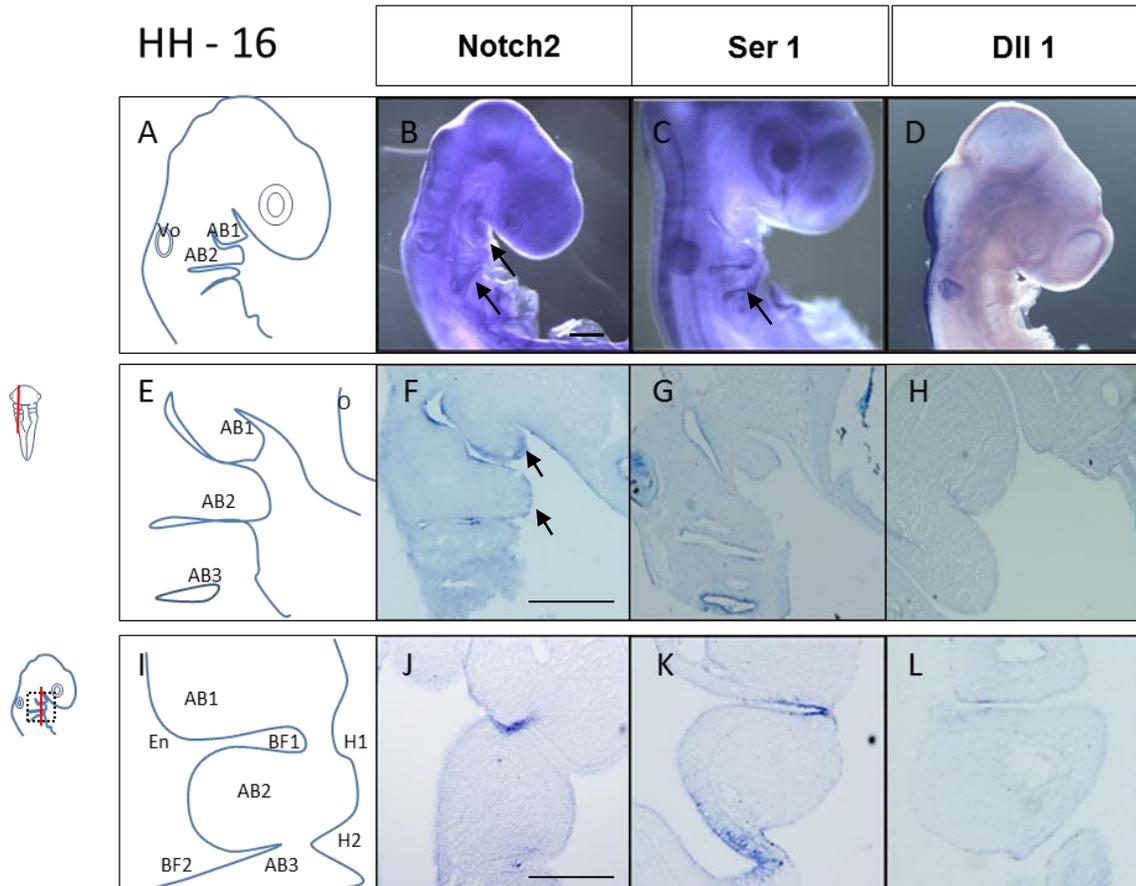


Figura 2-3. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH16. (A, B, C y D) Vista lateral de embriones completos. (E, F, G y H) Cortes sagitales. (I, J, K y L) Cortes coronales. Barras de 500 μ m.



2.2.3. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH19

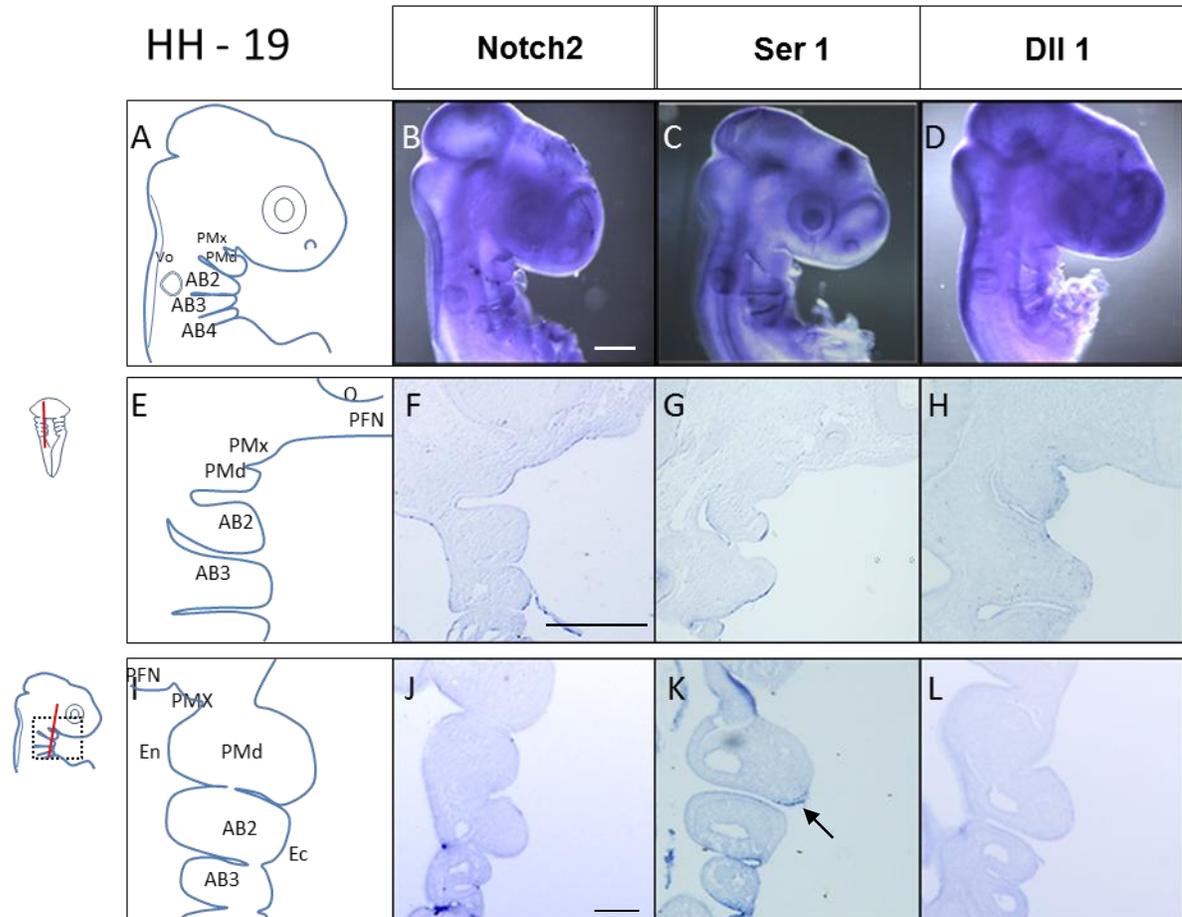
Entre las 72 y las 76 horas después de iniciar la incubación se obtuvieron embriones en el estadio HH19, en donde el embrión de pollo tiene un tamaño de casi 16 mm de longitud cefalo-caudal, con un número de somitas entre 32 y 36, desarrollo de los brotes de las alas y las patas, y un evidente encorvamiento del embrión, ubicando la porción más caudal en frente de la cabeza, también se evidencia un leve pronunciación de la prominencia maxilar.

Notch2 se expresa en la vesícula ótica y en el epitelio de la primera y segunda bolsa faríngea, que se extiende en menor intensidad al mesénquima circundante, así como en el ectodermo que recubre la prominencia maxilar en desarrollo (Figura 2 - 4, B, F y J).

La expresión de *Ser1*, en whole mount se mantiene y se hace más marcada en las hendiduras 1, 2, 3 y 4 (Figura 2- 4, C), lo cual se confirma en el corte coronal (Figura 2- 4,

K, flechas) y claramente se observa en el ectodermo que recubre el área ventral de los procesos maxilar y mandibular, así como el que recubre la zona más caudal del segundo arco (Figura 2- 4, G). En cuanto al gen *Dll1*, sólo se evidencia señal en la vesícula ótica y la médula espinal (Figura 2 - 4, D, H y L).

Figura 2-4. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH19. (A, B, C y D) Vista lateral de embriones completos. (E, F, G y H) Cortes sagitales. (I, J, K y L) Cortes coronales. Barras de 800 μ m.



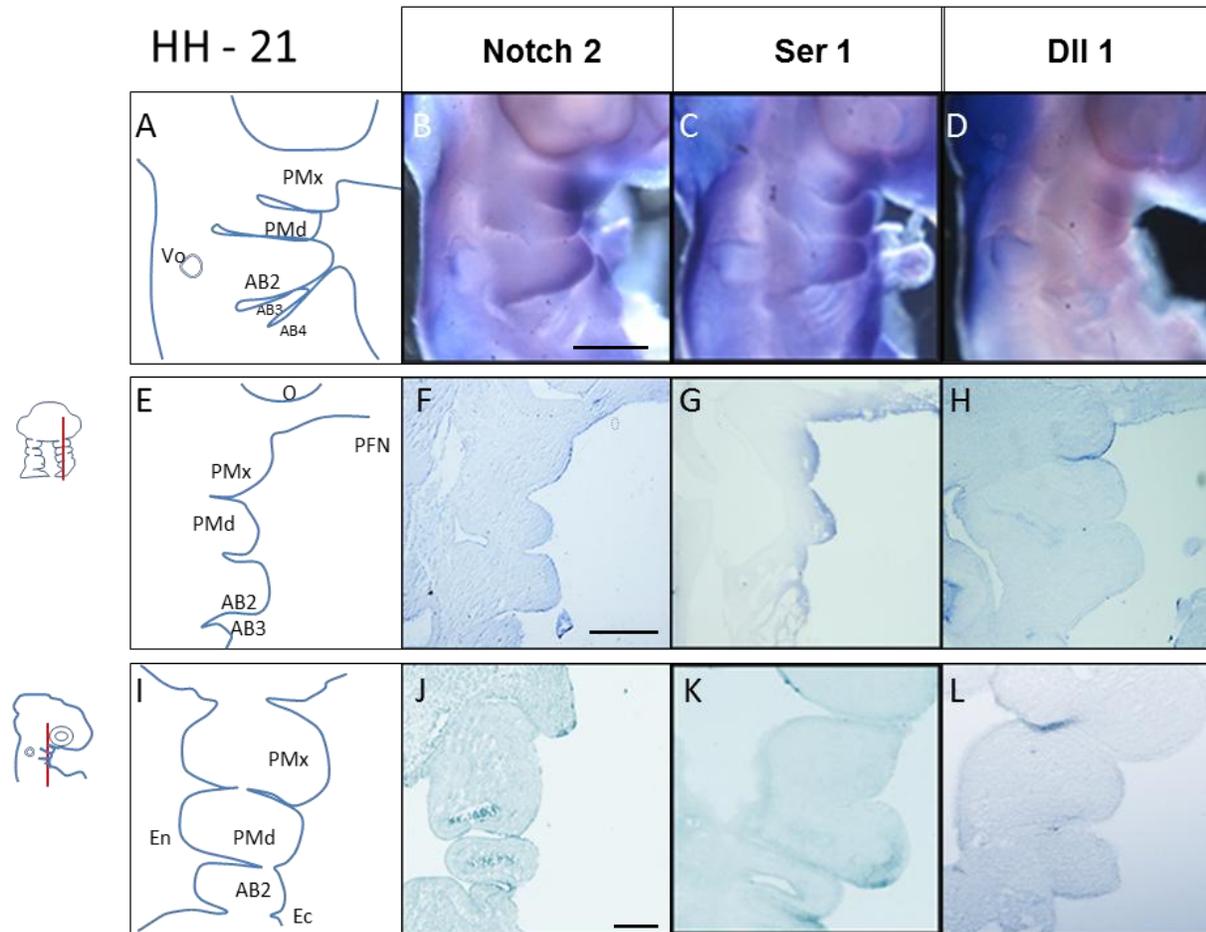
2.2.4 Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH21

Se obtuvieron embriones en el estadio HH21 a los 4 días post incubación, caracterizados principalmente por un crecimiento de los apéndices de alas y patas, y un ojo de tamaño que ocupa casi un tercio de la cara; la prominencia maxilar se evidencia de mayor tamaño y crece medialmente, al igual que la prominencia mandibular aunque en menor proporción.

En cuanto a la expresión del gen *Notch2*, se detecta en el ectodermo que recubre las prominencias maxilares y mandibulares. También se observan señales en el epitelio caudal de AB2 y la porción más ventral de este mismo, y aparentemente una señal de baja intensidad en la zona anterior de la prominencia frontonasal (Figura 2-5, B, F y J).

La expresión de *Ser1*, es muy similar a la de *Notch2* aunque mucho más marcada en la porción anterior de las prominencias maxilares, mandibulares, y del segundo arco; así mismo como en el epitelio caudal de éste. (Figura 2- 5, C, G y K). De otro lado, el gen *Dll1* se expresa en el ectodermo que recubre la prominencia maxilar (Figura 2 - 3, D, H y L).

Figura 2-5. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH21. (A, B, C y D) Vista lateral de embriones completos. (E, F, G y H) Cortes sagitales. (I, J, K y L) Cortes coronales. Barras de 1000 μ m.



2.2.5 Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH23

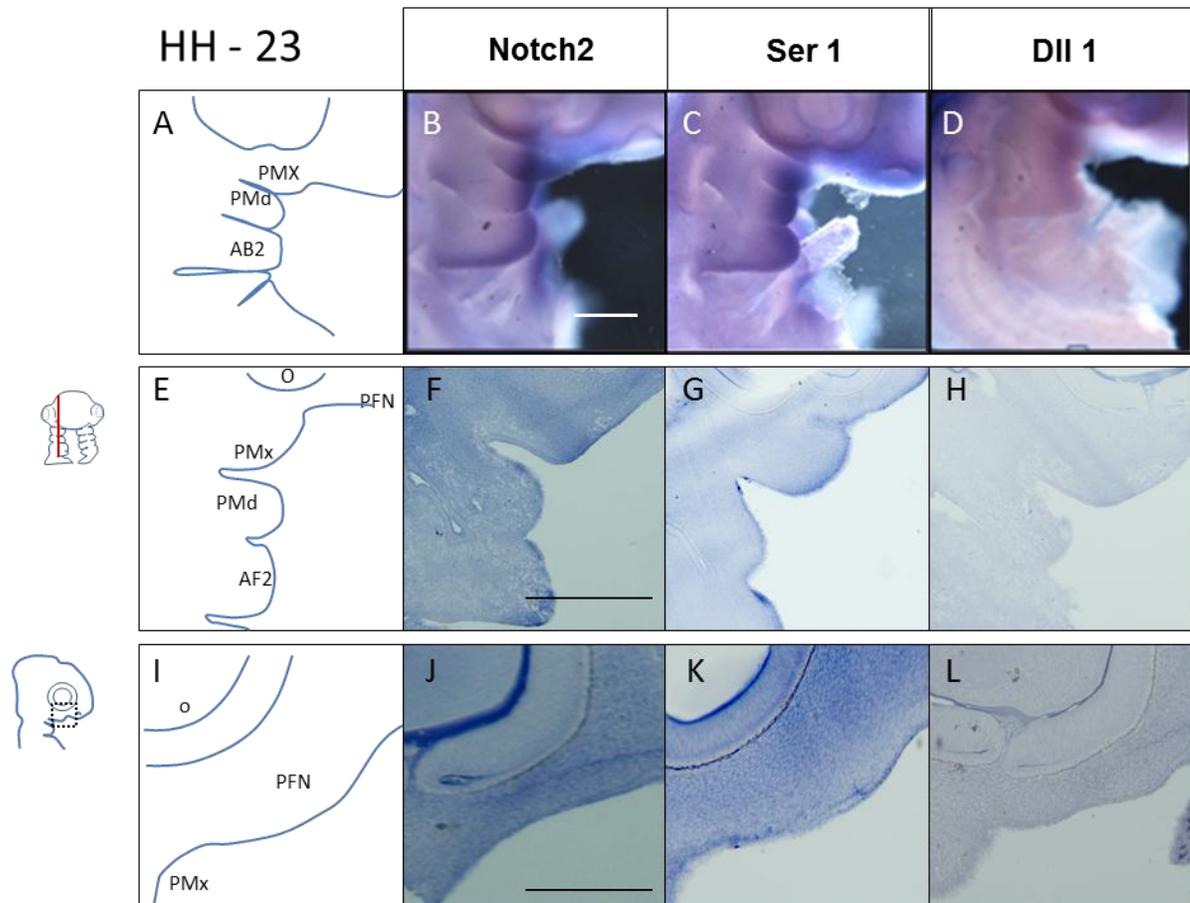
El HH23 es un estadio que se logra después de 5 días de incubación. Su desarrollo es muy similar al HH21 pero de mayor tamaño, aumenta el tamaño de las alas y mucho más

las patas, que además muestran levemente los vestigios de los espacios interdigitales, el ojo toma una dominancia en el contexto de la cara y en cuanto a la zona de interés, las prominencias maxilar y mandibular crecen anteriormente hasta llegar nivel del borde anterior del ojo.

Notch2, en *whole mount* sigue el patrón de expresión del estadio anterior, con una marca positiva en la zona ventral de las prominencias maxilares, mandibulares, en la zona caudal de AB2 y la porción más ventral de este mismo (Figura 2-6, B), los cortes confirman la señal en el ectodermo y en cuanto a la prominencia frontonasal se observa marcada expresión en el ectodermo, y una señal de baja intensidad en el mesénquima. (Figura 2-6, J).

La expresión de *Ser1* persiste en la porción anterior de las prominencias maxilares, mandibulares, de AB2 en el ectodermo que lo recubre, en el ectodermo caudal. (Figura 2-5, C, G y K) Un patrón muy similar a *Notch2* en la PFN. En cuanto al gen *Dll1* sigue sin señal alguna en arcos o en prominencias (Figura 2 - 6, D, H y L).

Figura 2-6. Patrones de expresión de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Dll1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo en estadio HH23. (A, B, C y D), Vista lateral de embriones completos.(E, F, G y H), cortes sagitales. (I, J, K y L), cortes coronales. Barras B y F 1000 μ m , J 1500 μ m



2.3 Discusión

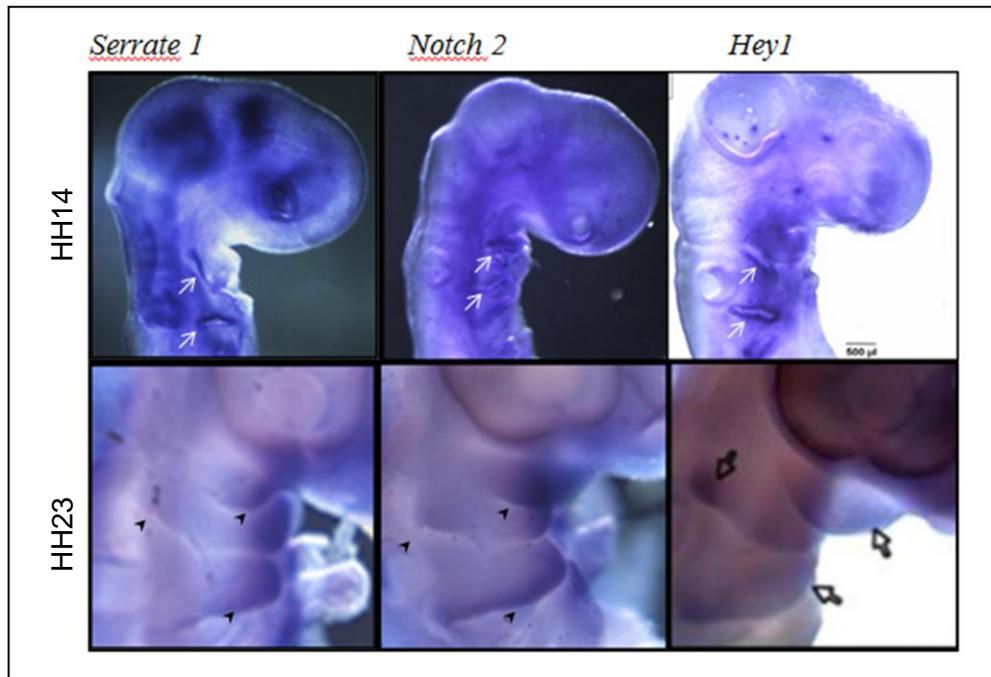
2.3.1. El rol de la vía de señalización Notch en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales.

En investigaciones recientes, que han utilizado el pollo como modelo de estudio de desarrollo, demostraron que la vía Notch está implicada en la organogénesis facial. Específicamente en el epitelio olfatorio, el gen *Notch2* ha sido asociado con eventos celulares tales como la proliferación y supervivencia celular (Rodríguez et al., 2008). También han sido fuertemente documentados los mecanismos de esta vía y en particular, *Ser1*, en el desarrollo del oído (Neves et al, 2011); de igual manera se ha reportado a *Notch1* asociado a procesos de neurogénesis, entre otros.

En estudios de análisis de expresión génica realizados anteriormente con otros genes de la vía notch (Bayona, 2012; Carbonell, 2012), *Notch1*, *Serrate2*, *Hes1* y *Hey1* en morfogénesis facial, se reportaron patrones de expresión en diferentes estadios, en arcos branquiales y prominencias faciales. Al analizarlos conjuntamente con los resultados del presente estudio, se presume una coexpresión en estadio HH14 de algunos genes componentes de la vía, sugiriendo con ello, que la vía podría permanecer activa a través de la expresión de *Ser1/Notch2/Hey1* (Ver Fig 2-7, A, B y C) en el epitelio de las bolsas faríngeas 1 y 2, así como en la bolsa faríngea 3, expresión que se sostiene en los estadios siguientes. Posteriormente los dominios se extienden al mesénquima ventral de las prominencias maxilar y mandibular y de AB2 (Fig 2-7, D, E y F), además de una señal intensa en la prominencia frontonasal tanto en epitelio como en mesénquima.

Los anteriores datos resultan cercanos con lo reportado en otras especies tales como la lamprea y el pez cebra (Kitt, 2013), en donde proponen que la vía permanece activa en la formación de las estructuras en mención desde el inicio del desarrollo de los arcos, pero a través de la interacción de otro ligando – receptor: *Jagged1a/Notch1/Hey1* y *Jag1/Notch1/Hey1*, respectivamente. Para el caso, *Jag1* en pez Zebra y *Jagged1a* en lamprea son homólogos de *Ser1* en pollos. Indicando que el ligando que está activando la vía en las estructuras estudiadas es el mismo en diferentes especies, pero actúa a través de otro receptor. Esto indica que la expresión de los receptores en estas etapas de desarrollo podría ser la que determina la función, y que solo se puede probar con más experimentos que impliquen la mutación de los receptores.

Figura 2-7. Patrones de expresión de los genes *Ser1/Notch2/Hey1* en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en embriones de pollo. Se observa aparentemente la coexpresión de ligando, receptor y efector en estadio HH 14 (A, B y C) y HH23 (D, E y F) en vista lateral de embriones completos.



Para finalizar, el gen *Delta1* exhibe una expresión en las zonas evaluadas muy similar al ratón (Barsi, Rajendra, Wu, y Artzt, 2005) en donde también muestra una señal limitada y de baja intensidad en AB1 en estadios iniciales del desarrollo craneofacial, y en estadios tardíos desaparece. Estos resultados sumados a lo descrito por Bayona y Carbonel (2013), y el análisis de expresión de *Delta4* en pollo (Nimmagadda et al., 2007), indicaría que los ligandos *Delta* de la vía Notch cumplen roles distintos a los ligandos *Serrate* en el desarrollo craneofacial, consistente con diferentes estudios realizados en otras estructuras, donde identificaron la diferencia funcional entre ligandos, a pesar de expresarse en poblaciones celulares contiguas (Choi et al., 2009; Ramos, Rocha, Gaspar, y Henrique, 2010). Y que su ausencia o mínima expresión en comparación con los otros ligandos de la vía, se puede deber a su conformación estructural, donde su dominio extracelular podría actuar como los ligandos *Serrate* activando la cascada *Notch*, pero su C-terminal si estuviera activo, podría desencadenar interacciones intracelulares (Wang, 2011), innecesarias en el desarrollo craneofacial. Otra posibilidad es que su ausencia de expresión puede deberse a competencia por interacción ligando – receptor.

Estos resultados en conjunto, son base para sugerir que la vía Notch es fundamental en la evolución del complejo craneofacial y el estudio a profundidad de cada componente permitirá dilucidar pasos importantes en la morfogénesis facial.

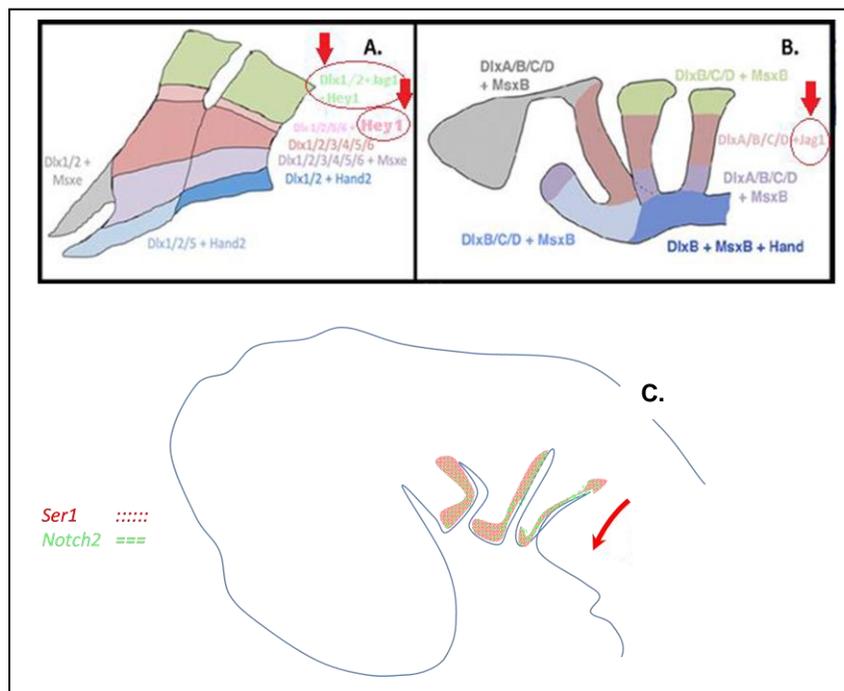
2.3.2. Establecimiento del patrón dorsoventral de arcos branquiales

En trabajos realizados en otras especies tales como la lamprea (Kitt, 2013) y pez cebra (Zuniga et al., 2010) se comprobó que la vía Notch a través de Notch1/Jag1a, juega un papel significativo en el establecimiento del patrón dorso ventral de la cabeza. Los autores además propusieron que la vía de señalización es crucial en el desarrollo de aspectos dorsales del maxilar, y la similitud que presentan entre estas especies sugieren que los cambios críticos que condujeron a la variabilidad de fenotipos se puede deber a factores corriente abajo de esta vía (Kitt, 2013), basados en la evidencia que demuestra que la expresión de los componentes de la vía permanecen tanto en una especie perteneciente a los agnatas, como en otra de los gnostomados.

Por el contrario, los resultados de nuestra investigación se oponen ciertamente de ésta sugerencia, debido a que los dominios de expresión de *Ser1* (*Jag1*) en el pollo están ubicados predominantemente en la región ventral durante el desarrollo de los AB, indicando de esta forma que la expresión es tejido específica según la especie, y con ello, se plantearía que las diferencias en los dominios de expresión también podrían estar determinando la variabilidad del fenotipo, además de factores corriente abajo de la señalización, lo que se podría probar con ex plantes en diferentes especies mutantes.

Por otra parte, específicamente, la expresión de *Notch2* en ratón se observa en arcos branquiales (Hamada et al., 1999) con predominio de la zona ventral de AB 1, 2 y 3, similar el patrón al visto en pez cebra (Lorent et al., 2004), resultados que son muy consistentes a los obtenidos en el presente trabajo, en donde los dominios de *Notch2* predominan en la región ventral.

Figura 2-8. Modelo de expresión dorso ventral de pez cebra, lamprea y pollo. Se reconoce el patrón dorsal de la señalización Notch en pez cebra y lamprea (A y B) (Kitt, 2013), a diferencia del pollo (C) que el patrón es mucho más ventral.



Esta evidente regionalización de la expresión puede estar guiando el direccionamiento y se plantea que su papel está limitado a la ventralización de los AB y quizás esté relacionado con el mantenimiento de poblaciones celulares y determinación de destinos celulares en poblaciones específicas cercanas al epitelio ventral, respaldado por los resultados exhibidos en un estudio en el que se evaluaron las CCN en mutantes de Hes (Kameda, 2013), en el que además se probó su importancia en el crecimiento de los órganos faríngeos.

2.3.3. El presumible rol de Ser1/Notch2/Hey1 en la segmentación faríngea

En los estadios iniciales del desarrollo faríngeo, se evidencia que los componentes de la vía a través *Ser1-Notch2* están expresados y sus dominios incluyen el epitelio de las bolsas faríngeas y en la medida en que van apareciendo las hendiduras su expresión es más notoria desde el endodermo.

En estudios previos realizados en pollos se ha presentado evidencia de la presencia de células apoptóticas en la zona de las hendiduras (Hirata y Hall, 2000). Por otra parte, en ratones se demostró que la vía *Jag1/Notch1–2* está asociada con procesos de apoptosis durante el desarrollo de patas, específicamente en la septación interdigital; en otro estudio, también en ratones, asociaron procesos de apoptosis en la degeneración de los pronefros y mesonefros con la vía Notch (Pole, Qi, y Beasley, 2002).

Aunque no haya sido objeto de estudio de la presente investigación, se puede confirmar que en los estadios de desarrollo en que se forman los mesonefros también se observan señales positivas intensas de los genes *Ser1* y *Notch2*; en estadios más avanzados del desarrollo, se evidencia la expresión marcada en la zona interdigital.

Estas observaciones adicionales son evidencia que permite sugerir que los genes *Ser1* y *Notch2* podrían estar asociados con la segmentación faríngea por medio de una posible regulación de la proliferación necesaria para definir los límites anatómicos y dar la morfología de los AB o también controlando el proceso de apoptosis que permitiría esculpir los contornos, al igual que sucede en el desarrollo de otras estructuras. Se requiere realizar experimentos de evaluación de apoptosis y proliferación en mutantes para comprobarlo.

2.3.4. Posible interacción de Notch con otras vías en el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales

La morfogénesis facial está regulada por una compleja red de interacciones entre diferentes vías de señalización tales como BMP, FGF, RA (Bothe et al., 2011) y SHH, entre otras. Aunque se tienen reportes acerca de la implicación de la vía de señalización Notch en anomalías del desarrollo craneofacial, lo que las hace tan complejas de comprender, son las interacciones entre ellas.

Una gran cantidad de reportes ha concluido que algunos componentes de la vía Notch requieren de la expresión de uno o más genes de otra vía para llevar una correcta señal (Katoh, 2006), o por el contrario, su expresión afecta otros genes corriente abajo. El desarrollo craneofacial no es la excepción, diversas investigaciones han confirmado la interacción entre BMPs y End en el establecimiento del patrón dorso - ventral del esqueleto craneofacial (Alexander et al., 2011).

En algunas investigaciones se ha reconocido el papel que cumple la vía de señalización Notch y su interacción con otras vías, incluso con la capacidad de modular la localización nuclear del carboxi terminal fosforilado de Smad2 y controlar la competencia de células ectodermales por ActivinA (Abe et al., 2005). La presente investigación comprueba que los dominios de expresión de la señalización *Ser1*, *Notch2* y *Hey1* se expresa similarmente a *Alk4* (un receptor tipo I de activin) (Stern, 1998) y con la expresión del mismo *ActvA* en los AB en los estadios tempranos de desarrollo, hallazgos de los que se podría conjeturar que las vías están interactuando en el ectodermo y determinando la competencia de las células ectodermales. De igual forma la expresión de *Bmp7* y *Ezr1* tiene una aparente coexpresión en las bolsas faríngeas, datos que permiten sugerir una posible interacción de la vía Notch con otras vías de señalización durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales

2.3.5. La señales en el epitelio caudal del segundo AB podrían constituirse como un centro de señalización faríngeo.

En anteriores estudios se demostró que existe una zona en el desarrollo craneofacial donde convergen señales de diferentes vías, denominada FEZ, la zona ectodérmica frontal -por su sigla en inglés-, que corresponde al ectodermo frontal que recubre la prominencia frontonasal, en la que se conocen expresiones tanto en mesénquima como en epitelio (Foppiano et al., 2007; Hu et al., 2003). La presente investigación comprueba que la vía Notch, es otra de las vías que también hace parte de ese conjunto de señales, con evidencias de expresión en células derivadas tanto del mesodermo como el ectodermo (Fig 2-6, J y K) de esta zona.

Por otra lado, se notó que en los arcos branquiales, y específicamente en el epitelio caudal del segundo arco, existe una convergencia de señales de moléculas provenientes de diferentes vías como por ejemplo *Bmp7* (Bothe et al., 2011), *Fgf8* (Haworth et al., 2007), *Elf2*, *Ezr* (Richter et al., 2004) y *Gcm2*, así mismo como factores de transcripción tales como *Barx1* (Haworth et al., 2007) y *HoxA3*. Algunos componentes de la vía de señalización también se expresan en este epitelio, tal es el caso de *Ser1* y *Notch2*, reportados en el presente trabajo, y *Hey1* reportado anteriormente (Bayona, 2012; Carbonell, 2012). Esta convergencia de señales permiten especular que el epitelio caudal del segundo arco branquial podría ser un centro de señalización, y la interacción de las vías que están presentes estarían regulando procesos importantes en el desarrollo.

2.4. Conclusiones y Recomendaciones

2.4.1. Conclusiones

Los patrones de expresión de los genes evaluados durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en el desarrollo del pollo permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los genes *Notch2* y *Ser1* se expresan durante el desarrollo de arcos branquiales, específicamente en la medida que aparecen las hendiduras faríngeas, lo que propone un importante rol en la segmentación faríngea.
2. Los patrones de *Ser1* y *Notch2* tienen una expresión aparentemente simultánea, lo que sugiere que podrían ser la interacción ligando – receptor que mantiene activa la vía notch durante el desarrollo de las prominencias maxilar, mandibular y frontonasal, indicando que tienen un rol potencialmente importante en la morfogénesis facial
3. El gen *Dll1* no se expresa en las estructuras evaluadas, tan solo se observa al inicio de la formación de arcos branquiales una señal de baja intensidad.

2.4.2 Recomendaciones

Los resultados obtenidos sugieren un rol potencial de los genes *Notch2* y *Ser1* de la vía de señalización Notch durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales, por lo que se sugiere realizar otra serie de experimentaciones que permitan comprobar su implicación con los eventos celulares que se dan lugar en estas etapas del desarrollo, por ello se recomienda:

1. Establecer la asociación de los genes *Notch2* y *Ser1* con los eventos celulares tales como proliferación, apoptosis, diferenciación y mantenimiento de poblaciones celulares en arcos branquiales y prominencias faciales.
2. Realizar estudios de pérdida y ganancia de función de los genes *Notch2*, *Ser1* y *Hey1*, que permita concluir acerca de la cascada de señalización de la vía Notch que permanece activa durante la morfogénesis facial, y el rol de cada uno de los componentes.
3. Establecer las posibles interacciones de la vía de señalización Notch con otras vías durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales.

3.Consideraciones éticas

3.1 Consideraciones ético-legales e impacto ambiental

La práctica con el modelo animal pollo (*Gallus gallus*) será guiada por *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS)("CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals," 1985), por la ley 84 de 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia, según el capítulo V acerca del sacrificio de animales (Congreso, 1989) y por el principio de las tres R: Reemplazo, Reducción y Refinamiento (Mrad y Cardozo, 1999).

En cuanto al reemplazo, este principio sugiere como alternativa el uso de embriones de vertebrados, como el embrión de pollo, para sustituir el uso de animales vivos. Con respecto a la reducción, para utilizar el mínimo número de embriones se tendrán en cuenta los protocolos de trabajos previos (Arboleda y Hurtado, 2009) llevados a cabo en el instituto con este modelo animal, así como un riguroso diseño experimental evaluado por el asesor estadístico para aprovechar al máximo las muestras y así conseguir los objetivos. Adicionalmente, la especie usada no tiene ningún compromiso con respecto a su peligro de extinción. Por último, en relación al refinamiento, el uso del modelo animal de pollo, en este caso específico el embrión, supone dolor nulo o mínimo estrés (molestias menores e invasividad categoría B) por la etapa del desarrollo donde se lleva a cabo el sacrificio. Por la misma razón el único medio de sacrificio es la fijación en paraformaldehído.

Para la eliminación de los embriones que no cumplan con los requerimientos del estudio, malformados, que se hayan fijado a la cáscara, contaminados, o que no prosperaron, así como el resto de material orgánico que no va a ser examinado, se seguirá el protocolo según el documento del PGIRH (Plan de gestión integral del residuos hospitalarios) vigente en el laboratorio de genética y aplicando las respectivas rutas de desecho de materiales clasificados como riesgo biológico.

3.2 Divulgación y propiedad intelectual

El marco en que se regirá es el acuerdo 035 del 2003, del Reglamento sobre propiedad Intelectual en la Universidad Nacional de Colombia. Los derechos de propiedad intelectual, patrimonial, y moral estarán a nombre de la Universidad Nacional de

Colombia como persona jurídica dado que es una obra creada bajo encargo y con relación laboral. Las publicaciones ya sean escritas o divulgación oral, que se generen a partir del proceso investigativo, se harán únicamente bajo el consentimiento y aprobación del comité pertinente de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional, y haciendo referencia a la línea a la que pertenece, grupo de investigación, facultad y sede.

Anexos

A. Anexo. Protocolo de hibridación In Situ sobre embrión completo

Día 1

1. Rehidratación de embriones en series de metanol diluido en PBT en 75%, 50% y 25% durante 5 minutos cada lavado
2. Tres enjuagues con PBT por 5 min cada uno a temperatura ambiente
3. Aplicación de 500µl de proteínasa K 10 µg/ml, según estadio de desarrollo del embrión:
 - HH 14: 10 min
 - HH 16: 10 min
 - HH 19: 15 min
 - HH 21: 15 min
 - HH 23: 25 min
4. Lavado con PBT por 5 minutos
5. Posfijación con PFA 4% por 30 minutos a temperatura ambiente
6. Dos enjuagues con PBT por 30 minutos cada uno
7. Lavado en solución de hibridación por 10 minutos a temperatura ambiente
8. Incubación en solución de hibridación por 2 horas a 65°C
9. Pre calentamiento de la sonda a 80°C 10 minutos antes de ponerla en contacto con los embriones.
10. Cambio de solución de hibridación por una fresca adicionando sonda (7.5 µl) e incubar toda la noche a 65°C bien sellado, en proporción 1:100

Día 2

1. Realizar tres lavados de 30 min cada uno a 65°C, con solución A precalentada a 65°C. Se ponen de 500 a 750 µl de solución por pozo, hasta cubrir completamente los embriones.
2. Tres lavados por 30 min c/uno a 65°C con solución B precalentada a 65°C.

3. Tres lavados con TBST fresco por 5 min a temperatura ambiente
4. Solución de bloqueo con suero fetal bovino 5% en TBST y albumina (BSA) (1mg/ml) por 3 horas o más a temperatura ambiente
5. Se aplica solución de TBST, suero, anticuerpo 1:2000, albumina (BSA) (1mg/ml) toda la noche a 4°C.

Día 3

1. Remoción de la solución de bloqueo con anticuerpo (se puede almacenar a 4°C para reutilizar).
2. Tres lavados en TBST de 5 min cada uno a temperatura ambiente
3. Cinco lavados con TBST por 1 hora cada uno a temperatura ambiente
4. Tres lavados en NTMT por 15 minutos cada uno a temperatura ambiente
6. Remoción de NTMT y se adiciona BCIP/NBT (26.6 µl/2ml) en NTMT, se deja en agitador bien asilado de la luz con papel aluminio y se controla cada 5 minutos en el estereoscopio
7. Cuatro enjuagues en PBT de 5 minutos cada uno
8. Posfijación en paraformaldehído al 4% por 30 minutos
9. Lavado en PBT y almacenamiento a 4°C aislado de la luz.

B. Anexo. Protocolo de Hibridación In Situ sobre cortes Histológicos

Día 1

1. Desparafinado de las placas durante 30 minutos en el horno a 60 °C
2. Dos lavados en xilol de 10 minutos cada uno
3. Lavado en etanol 100% por 2 minutos
4. Hidratación de las láminas en series de etanol en PBR 100, 90, 70 y 50%
5. Un lavado en PBS/DEPC por 5 minutos
6. Fijación en PFA 4% durante 20 minutos
7. Dos lavados en PBS/DEPC de 5 minutos

8. Incubación en proteinasa K (10µg/ml PBS) a temperatura ambiente durante 15 minutos
9. Lavado en PBS/DEPC durante 1 minuto
10. Lavado de PFA 4% por 20 minutos
11. Lavado en DEPC 0.1 M trietanolamina (200 ml) con anhídrido acético por 10 minutos. Se agrega directamente sobre las placas 500µl de anhídrido acético, debe ser rápido a temperatura ambiente
12. Lavado en PBS/DEPC por 5 minutos
13. Deshidratación en series de etanol 30, 50, 70, 80, 90 y 100% agitando el lavado por 1 minuto
14. Secado de las placas por 30 minutos, cubriéndolas
15. Agregar sonda a 60 °C por 16 horas

Día 2

1. Sumergir las láminas 2x SSC con CHAPS 0,1% y precaliente la solución por 30 minutos usando shaker
2. Agregue 1µg/ml de RNasa al 2x SSC a 37 °C por 30 minutos y enjuague dos veces con 2x SSC a temperatura ambiente
3. Lave con 2x SSC precalentado con Chaps =,1% a 65 °C por 20 minutos tres veces
4. Lave con 0,2 x SSC precalentado con chaps 0,1% a 65 °C por 20 tres veces durante 20 minutos cada uno.
5. Enjuague con PBT a temperatura ambiente por 10 minutos dos veces
6. Prebloquee con suero de cabra 20% en PBT por 2-3 horas a temperatura ambiente
7. Incube en Anticuerpo a una dilución de 1:2000 en suero 20% en PBT por toda la noche, dejando bien cubiertas las placas

Día 3

1. Lave 6 veces con PBT que contenga levamisole 1 mM a temperatura ambiente por 30 minutos

2. Lave 2 veces con NTMT por 15 minutos
3. Preparar solución reveladora: 1 pellet (NBT/BCIP) por 10ml de NTMT
4. Adicionar la solución reveladora y revelar en completa oscuridad a 4 °C
5. Chequee las señales cada 2 horas
6. Lave con PBT por 5 minutos
7. Fijación en PFA 4 % por 20 minutos
8. Lave con PBT, deje secar por 10 minutos y monte las láminas

Bibliografía

- Abe, T., Furue, M., Kondow, A., Matsuzaki, K., & Asashima, M. (2005). Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxy-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A. *Mech Dev*, 122(5), 671-680. doi: 10.1016/j.mod.2004.12.006
- Acloque, H., Wilkinson, D. G., Nieto, M. A., & Dr. Marianne, B.-F. (2008). Chapter 9 In Situ Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole-Mount and Tissue Sections *Methods in Cell Biology* (Vol. Volume 87, pp. 169-185): Academic Press.
- Akimoto, M., Kameda, Y., Arai, Y., Miura, M., Nishimaki, T., Takeda, A., & Uchinuma, E. (2010). Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J Craniofac Surg*, 21(5), 1443-1449. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181ebd1a0
- Alexander, C., Zuniga, E., Blitz, I. L., Wada, N., Le Pabic, P., Javidan, Y., . . . Schilling, T. F. (2011). Combinatorial roles for BMPs and Endothelin 1 in patterning the dorsal-ventral axis of the craniofacial skeleton. *Development*, 138(23), 5135-5146. doi: 10.1242/dev.067801
- Andersson, E. R., Sandberg, R., & Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. doi: 10.1242/dev.063610
- Antin, P., Bell, G., & Yatskievych, T. (2004). GEISHA, a high throughput whole mount in situ hybridization screen in chick embryos. *Devel. Dynamics*, 229, 677-687.
- Arboleda, H., & Hurtado, K. (2009). *Aproximación a la identificación y aislamiento de células pioneras en etapas tempranas del neurodesarrollo en el modelo de pollo*. (Medicina), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Arredondo de Arreola, G., Lopez Serna, N., de Hoyos Parra, R., & Arreola Salinas, M. A. (1996). Morphogenesis of the lateral nasal wall from 6 to 36 weeks. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 114(1), 54-60.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415), 770-776.
- Barsi, J. C., Rajendra, R., Wu, J. I., & Artzt, K. (2005). Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mech Dev*, 122(10), 1106-1117. doi: 10.1016/j.mod.2005.06.005
- Bayona, F. (2012). *Vía de señalización Notch durante el desarrollo de arcos branquiales en el embrio de pollo: estadios HH14 a HH18*. (Magíster), Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría. (2-)

- Bell, E., Ensini, M., Gulisano, M., & Lumsden, A. (2001). Dynamic domains of gene expression in the early avian forebrain. *Dev Biol*, 236(1), 76-88. doi: 10.1006/dbio.2001.0301
- Bento, M., Correia, E., Tavares, A. T., Becker, J. D., & Belo, J. A. (2011). *Gene Expression Patterns*, 11(7), 437-447.
- Bollerot, K., Romero, S., Dunon, D., & Jaffredo, T. (2005). Core binding factor in the early avian embryo: cloning of Cbfbeta and combinatorial expression patterns with Runx1. *Gene Expr Patterns*, 6(1), 29-39. doi: 10.1016/j.modgep.2005.05.003
- Bothe, I., Tenin, G., Oseni, A., & Dietrich, S. (2011). Dynamic control of head mesoderm patterning. *Development*, 138(13), 2807-2821. doi: 10.1242/dev.062737
- Brimacombe, K. R., & Ladd, A. N. (2007). Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family. *Dev Dyn*, 236(8), 2216-2224. doi: 10.1002/dvdy.21209
- Carbonell, B. (2012). *Patrones de expresión de los genes Notch1, Serrate 2 y genes Diana en la vía de señalización Notch en el desarrollo de las prominencias faciales*. (Magíster), Univesidad Nacional de Colombia. (3-)
- Casey, L. M., Lan, Y., Cho, E. S., Maltby, K. M., Gridley, T., & Jiang, R. (2006). Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn*, 235(7), 1830-1844. doi: 10.1002/dvdy.20821
- Cerny, R., Lwigale, P., Ericsson, R., Meulemans, D., Epperlein, H. H., & Bronner-Fraser, M. (2004). Developmental origins and evolution of jaws: new interpretation of "maxillary" and "mandibular". *Dev Biol*, 276(1), 225-236. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.046
- Cheng, J., & Elden, L. (2012). Management of pediatric second branchial fistulae: is tonsillectomy necessary? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 76(11), 1601-1603. doi: 10.1016/j.ijporl.2012.07.024
- Choi, K., Ahn, Y. H., Gibbons, D. L., Tran, H. T., Creighton, C. J., Girard, L., . . . Kurie, J. M. (2009). Distinct biological roles for the notch ligands Jagged-1 and Jagged-2. *J Biol Chem*, 284(26), 17766-17774. doi: 10.1074/jbc.M109.003111
- CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. (1985). *Altern Lab Anim*, 12(4), ii-.
- Congreso, C. (1989). *Ley 84 de 1989, Estatuto Nacional de Protección a animales*. Colombia.
- Cordero, D. R., Brugmann, S., Chu, Y., Bajpai, R., Jame, M., & Helms, J. A. (2011). Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A*, 155a(2), 270-279. doi: 10.1002/ajmg.a.33702
- Cordle, J., Redfieldz, C., Stacey, M., van der Merwe, P. A., Willis, A. C., Champion, B. R., . . . Handford, P. A. (2008). Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J Biol Chem*, 283(17), 11785-11793. doi: 10.1074/jbc.M708424200

- Cuervo, R., & Covarrubias, L. (2004). Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development*, *131*(1), 15-24. doi: 10.1242/dev.00907
- Currarino, G. (2009). Hajdu-Cheney syndrome associated with serpentine fibulae and polycystic kidney disease. *Pediatr Radiol*, *39*(1), 47-52. doi: 10.1007/s00247-008-0992-9
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., & Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands *Curr Top Dev Biol* (Vol. 92, pp. 73-129). United States: 2010 Elsevier Inc.
- Darnell, D. K., Kaur, S., Stanislaw, S., Davey, S., Konieczka, J. H., Yatskievych, T. A., & Antin, P. B. (2007). GEISHA: An In situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo. *Cytogenet. Genome Res.*, *117*, 30-35.
- Daudet, N., Ariza-McNaughton, L., & Lewis, J. (2007). Notch signalling is needed to maintain, but not to initiate, the formation of prosensory patches in the chick inner ear. *Development*, *134*(12), 2369-2378. doi: 10.1242/dev.001842
- Delaurier, A., Nakamura, Y., Braasch, I., Khanna, V., Kato, H., Wakitani, S., . . . Kimmel, C. B. (2012). Histone deacetylase-4 is required during early cranial neural crest development for generation of the zebrafish palatal skeleton *BMC Dev Biol* (Vol. 12, pp. 16). England.
- Dorfman, M. D., Kerr, B., Garcia-Rudaz, C., Paredes, A. H., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (2011). Neurotrophins acting via TRKB receptors activate the JAGGED1-NOTCH2 cell-cell communication pathway to facilitate early ovarian development. *Endocrinology*, *152*(12), 5005-5016. doi: 10.1210/en.2011-1465
- Eblaghie, M. C., Lunn, J. S., Dickinson, R. J., Munsterberg, A. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Farrell, E. R., . . . Tickle, C. (2003). Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol*, *13*(12), 1009-1018.
- Fiuza, U. M., & Arias, A. M. (2007). Cell and molecular biology of Notch *J Endocrinol* (Vol. 194, pp. 459-474). England.
- Foerst-Potts, L., & Sadler, T. W. (1997). Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev Dyn*, *209*(1), 70-84. doi: 10.1002/(sici)1097-0177(199705)209:1<70::aid-aja7>3.0.co;2-u
- Foppiano, S., Hu, D., & Marcucio, R. S. (2007). Signaling by bone morphogenetic proteins directs formation of an ectodermal signaling center that regulates craniofacial development. *Dev Biol*, *312*(1), 103-114. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.016
- Francis-West, P., Ladher, R., Barlow, A., & Graveson, A. (1998). Signalling interactions during facial development. *Mechanisms of Development*, *75*(1-2), 3-28.

- Fraser, P. E., & Sauka-Spengler, T. (2004). Expression of the polycomb group gene *bmi-1* in the early chick embryo. *Gene Expr Patterns*, 5(1), 23-27. doi: 10.1016/j.modgep.2004.06.011
- Gaspar, J., Thai, S., Volland, C., Dube, A., Libermann, T. A., Iruela-Arispe, M. L., & Oettgen, P. (2002). Opposing functions of the Ets factors NERF and ELF-1 during chicken blood vessel development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(7), 1106-1112.
- Gasperowicz, M., Rai, A., & Cross, J. C. (2013). Spatiotemporal expression of Notch receptors and ligands in developing mouse placenta. *Gene Expr Patterns*, 13(7), 249-254. doi: 10.1016/j.gep.2013.04.006
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Antoni, L., Fu, K., Whiting, C. J., Francis-West, P., & Richman, J. M. (2009). Expression of WNT signalling pathway genes during chicken craniofacial development. *Dev Dyn*, 238(5), 1150-1165. doi: 10.1002/dvdy.21934
- Geisha. (2014). Data for this paper was retrieved from the GEISHA database, University of Arizona, Tucson, AZ 85724; World Wide Web URL: <http://geisha.arizona.edu>; [date data was retrieved].
- Gimeno, L., & Martinez, S. (2007). Expression of chick *Fgf19* and mouse *Fgf15* orthologs is regulated in the developing brain by *Fgf8* and *Shh*. *Dev Dyn*, 236(8), 2285-2297. doi: 10.1002/dvdy.21237
- Gitton, Y., Heude, E., Vieux-Rochas, M., Benouaiche, L., Fontaine, A., Sato, T., . . . Levi, G. (2010). Evolving maps in craniofacial development *Semin Cell Dev Biol* (Vol. 21, pp. 301-308). England: 2010 Elsevier Ltd.
- Goff, C. J., Allred, C., & Glade, R. S. (2012). Current management of congenital branchial cleft cysts, sinuses, and fistulae. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 20(6), 533-539. doi: 10.1097/MOO.0b013e32835873fb
- Graham, A. (2003). Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A*, 119a(3), 251-256. doi: 10.1002/ajmg.a.10980
- Graham, A., Begbie, J., & McGonnell, I. (2004). Significance of the cranial neural crest. *Dev Dyn*, 229(1), 5-13. doi: 10.1002/dvdy.10442
- Greenwald, I., & Kovall, R. (2013). Notch signaling: genetics and structure. *WormBook*, 1-28. doi: 10.1895/wormbook.1.10.2
- Grevellec, A., Graham, A., & Tucker, A. S. (2011). *Shh* signalling restricts the expression of *Gcm2* and controls the position of the developing parathyroids. *Dev Biol*, 353(2), 194-205. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.02.012
- Grevellec, A., & Tucker, A. S. (2010). The pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives. *Semin Cell Dev Biol*, 21(3), 325-332. doi: 10.1016/j.semcd.2010.01.022
- Gu, J. M., Hu, Y. Q., Zhang, H., Wang, C., Hu, W. W., Yue, H., . . . Zhang, Z. L. (2013). A mutation in *NOTCH2* gene in a Chinese patient with Hajdu-Cheney syndrome. *Joint Bone Spine*. doi: 10.1016/j.jbspin.2013.02.008
- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J. R., & Tsujimoto, Y. (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse *Notch2* gene induces early embryonic lethality. *Development*, 126(15), 3415-3424.

- Hamburger, V., & Hamilton, H. (1992). *A series of normal stages in the development of the chick embryo* (R. i. D. Dynamics Ed. Vol. 195): Journal of Morphology.
- Haworth, K. E., Wilson, J. M., Grevellec, A., Cobourne, M. T., Healy, C., Helms, J. A., . . . Tucker, A. S. (2007). Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of Fgf8 in head ectoderm. *Dev Biol*, 303(1), 244-258. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.009
- Hedge, T. A., & Mason, I. (2008). Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo. *Int J Dev Biol*, 52(1), 81-85. doi: 10.1387/ijdb.072355th
- Hirata, M., & Hall, B. K. (2000). Temporospatial patterns of apoptosis in chick embryos during the morphogenetic period of development. *Int J Dev Biol*, 44(7), 757-768.
- Homma, S., Oppenheim, R. W., Yaginuma, H., & Kimura, S. (2000). Expression pattern of GDNF, c-ret, and GFRalphas suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo. *Dev Biol*, 217(1), 121-137. doi: 10.1006/dbio.1999.9543
- Hori, K., Sen, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 10), 2135-2140. doi: 10.1242/jcs.127308
- Hu, D., Marcucio, R. S., & Helms, J. A. (2003). A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development*, 130(9), 1749-1758.
- Humphreys, R., Zheng, W., Prince, L. S., Qu, X., Brown, C., Loomes, K., . . . Goudy, S. (2012). Cranial neural crest ablation of Jagged1 recapitulates the craniofacial phenotype of Alagille syndrome patients. *Hum Mol Genet*, 21(6), 1374-1383. doi: 10.1093/hmg/ddr575
- Iseki, S. (2011). Disintegration of the medial epithelial seam: is cell death important in palatogenesis? *Dev Growth Differ*, 53(2), 259-268. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01245.x
- Ishii, M., Arias, A. C., Liu, L., Chen, Y. B., Bronner, M., & Maxson, R. E. (2012). A Stable Cranial Neural Crest Cell Line from Mouse. *Stem Cells Dev*. doi: 10.1089/scd.2012.0155
- Isidor, B., Le Merrer, M., Exner, G. U., Pichon, O., Thierry, G., Guiochon-Mantel, A., . . . Le Caignec, C. (2011). Serpentine fibula-polycystic kidney syndrome caused by truncating mutations in NOTCH2. *Hum Mutat*, 32(11), 1239-1242. doi: 10.1002/humu.21563
- Isidor, B., Lindenbaum, P., Pichon, O., Bezieau, S., Dina, C., Jacquemont, S., . . . Le Caignec, C. (2011). Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet*, 43(4), 306-308. doi: 10.1038/ng.778
- Jeliazkova, P., Jors, S., Lee, M., Zimmer-Strobl, U., Ferrer, J., Schmid, R. M., . . . Geisler, F. (2013). Canonical Notch2 signaling determines biliary cell fates of embryonic hepatoblasts and adult hepatocytes independent of Hes1. *Hepatology*, 57(6), 2469-2479. doi: 10.1002/hep.26254

- Jiang, R., Bush, J. O., & Lidral, A. C. (2006). Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*, 235(5), 1152-1166. doi: 10.1002/dvdy.20646
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., . . . Gridley, T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev*, 12(7), 1046-1057.
- Joice, P., Sudarshan, T., & Hussain, S. S. (2012). First branchial arch abnormality: diagnostic dilemma and excision with facial nerve preservation. *J Laryngol Otol*, 126(9), 918-922. doi: 10.1017/s0022215112001508
- Kamath, B. M., Bauer, R. C., Loomes, K. M., Chao, G., Gerfen, J., Hutchinson, A., . . . Spinner, N. B. (2011). NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *Journal of Medical Genetics*. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100544
- Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., Iseki, S., & Fujimura, T. (2013). Hes1 is required for the development of pharyngeal organs and survival of neural crest-derived mesenchymal cells in pharyngeal arches. *Cell Tissue Res*, 353(1), 9-25. doi: 10.1007/s00441-013-1649-z
- Kamimura, M., Matsumoto, K., Koshiba-Takeuchi, K., & Ogura, T. (2004). Vertebrate crossveinless 2 is secreted and acts as an extracellular modulator of the BMP signaling cascade. *Dev Dyn*, 230(3), 434-445. doi: 10.1002/dvdy.20069
- Katoh, M. (2006). Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med*, 17(4), 681-685.
- Kenealy, J. F., Torsiglieri, A. J., Jr., & Tom, L. W. (1990). Branchial cleft anomalies: a five-year retrospective review. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 42, 1022-1025.
- Khatri, S. B., & Groves, A. K. (2013). Expression of the Foxi2 and Foxi3 transcription factors during development of chicken sensory placodes and pharyngeal arches. *Gene Expr Patterns*, 13(1-2), 38-42. doi: 10.1016/j.gep.2012.10.001
- Kiefer, J. C., & Hauschka, S. D. (2001). Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. *Dev Biol*, 232(1), 77-90. doi: 10.1006/dbio.2000.0114
- Kitt, M. (2013). *Exploration and analysis of Jagged/Notch signaling in lamprey pharyngeal arches*. (Magister of Science), University of Colorado at Boulder.
- Klewer, S. E., Yatskievych, T., Pogreba, K., Stevens, M. V., Antin, P. B., & Camenisch, T. D. (2006). Has2 expression in heart forming regions is independent of BMP signaling. *Gene Expr Patterns*, 6(5), 462-470. doi: 10.1016/j.modgep.2005.11.005
- Kovall, R. A. (2007). Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. *Curr Opin Struct Biol*, 17(1), 117-127. doi: 10.1016/j.sbi.2006.11.004

- Kraman, M., & McCright, B. (2005). Functional conservation of Notch1 and Notch2 intracellular domains. doi: 10.1096/fj.04-3407fje
- Kumamoto, H., & Ohki, K. (2008). Detection of Notch signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*, 37(4), 228-234. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00629.x
- Kumar, M., & Chapman, S. C. (2012). Cloning and expression analysis of Fgf5, 6 and 7 during early chick development. *Gene Expr Patterns*, 12(7-8), 245-253. doi: 10.1016/j.gep.2012.05.002
- Kuratani, S. (2005). Cephalic neural crest cells and the evolution of craniofacial structures in vertebrates: morphological and embryological significance of the premandibular–mandibular boundary. *Zoology*, 108(1), 13-25. doi: 10.1016/j.zool.2004.12.001
- Ladher, R. K., Church, V. L., Allen, S., Robson, L., Abdelfattah, A., Brown, N. A., . . . Francis-West, P. H. (2000). Cloning and expression of the Wnt antagonists Sfrp-2 and Frzb during chick development. *Dev Biol*, 218(2), 183-198. doi: 10.1006/dbio.1999.9586
- Lan, K., Verma, S. C., Murakami, M., Bajaj, B., Kaul, R., & Robertson, E. S. (2007). Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen stabilizes intracellular activated Notch by targeting the Sel10 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(41), 16287-16292. doi: 10.1073/pnas.0703508104
- Lee, S. H., Bedard, O., Buchtova, M., Fu, K., & Richman, J. M. (2004). A new origin for the maxillary jaw. *Dev Biol*, 276(1), 207-224. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.045
- Lee, S. K., Kim, Y. S., Oh, H. S., Yang, K. H., Kim, E. C., & Chi, J. G. (2001). Prenatal development of the human mandible. *Anat Rec*, 263(3), 314-325.
- Lehar, S. M., Dooley, J., Farr, A. G., & Bevan, M. J. (2005). Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood*, 105(4), 1440-1447. doi: 10.1182/blood-2004-08-3257
- Leticia, S., Maria, L.-G., & Erika, M.-M. (2006). Vía de Señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento del cancer. *Salud Pública de México*, 48, 155-164.
- Levi, B., Brugmann, S., & Longaker, M. T. (2010). Discussion: Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J Craniofac Surg*, 21(5), 1450-1451. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181ecc54b
- Li, H., & Williams, T. (2013). Separation of mouse embryonic facial ectoderm and mesenchyme. *J Vis Exp*(74). doi: 10.3791/50248
- Lin, J., Redies, C., & Luo, J. (2007). Regionalized expression of ADAM13 during chicken embryonic development. *Dev Dyn*, 236(3), 862-870. doi: 10.1002/dvdy.21071
- Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A., & Weinmaster, G. (2013). Expression Patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 Genes

- Identify Ligand–Receptor Pairs That May Function in Neural Development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(1), 14-27.
- Liu, B., Rooker, S. M., & Helms, J. A. (2010). Molecular control of facial morphology. *Semin Cell Dev Biol*, 21(3), 309-313. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.09.002
- Loomes, K. M., Stevens, S. A., O'Brien, M. L., Gonzalez, D. M., Ryan, M. J., Segalov, M., . . . Kusumi, K. (2007). Dll3 and Notch1 genetic interactions model axial segmental and craniofacial malformations of human birth defects. *Dev Dyn*, 236(10), 2943-2951. doi: 10.1002/dvdy.21296
- Lorent, K., Yeo, S. Y., Oda, T., Chandrasekharappa, S., Chitnis, A., Matthews, R. P., & Pack, M. (2004). Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development*, 131(22), 5753-5766. doi: 10.1242/dev.01411
- Martinez-Alvarez, C., Tudela, C., Perez-Miguelsanz, J., O'Kane, S., Puerta, J., & Ferguson, M. W. (2000). Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev Biol*, 220(2), 343-357. doi: 10.1006/dbio.2000.9644
- Matsuda, Y., Wakamatsu, Y., Kohyama, J., Okano, H., Fukuda, K., & Yasugi, S. (2005). Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development*, 132(12), 2783-2793. doi: 10.1242/dev.01853
- McDaniell, R., Warthen, D. M., Sanchez-Lara, P. A., Pai, A., Krantz, I. D., Piccoli, D. A., & Spinner, N. B. (2006). NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet*, 79(1), 169-173. doi: 10.1086/505332
- McGill, M. A., & McGlade, C. J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*, 278(25), 23196-23203. doi: 10.1074/jbc.M302827200
- McGonnell, I. M., Graham, A., Richardson, J., Fish, J. L., Depew, M. J., Dee, C. T., . . . Takahashi, T. (2011). Evolution of the Alx homeobox gene family: parallel retention and independent loss of the vertebrate Alx3 gene. *Evol Dev*, 13(4), 343-351. doi: 10.1111/j.1525-142X.2011.00489.x
- Medio, M., Yeh, E., Popelut, A., Babajko, S., Berald, A., & Helms, J. A. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and Msx1 promote outgrowth of the maxillary prominences. *Front Physiol*, 3, 375. doi: 10.3389/fphys.2012.00375
- Meliou, E., Kerezoudis, N., Tosios, K., Lafkas, D., & Kiaris, H. (2011). Immunohistochemical expression of Notch signaling in the lining epithelium of periapical cysts. *J Endod*, 37(2), 176-180. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.007
- Meng, H., Zhang, X., Yu, G., Lee, S. J., Chen, Y. E., Prudovsky, I., & Wang, M. M. (2012). Biochemical characterization and cellular effects of CADASIL mutants of NOTCH3. *PLoS One*, 7(9), e44964. doi: 10.1371/journal.pone.0044964

- Miele, L., Golde, T., & Osborne, B. (2006). Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med*, 6(8), 905-918.
- Minoux, M., Antonarakis, G. S., Kmita, M., Duboule, D., & Rijli, F. M. (2009). Rostral and caudal pharyngeal arches share a common neural crest ground pattern. *Development*, 136(4), 637-645. doi: 10.1242/dev.028621
- Minoux, M., & Rijli, F. M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development *Development* (Vol. 137, pp. 2605-2621). England.
- Mitsiadis, T. A., Romeas, A., Lendahl, U., Sharpe, P. T., & Farges, J. C. (2003). Notch2 protein distribution in human teeth under normal and pathological conditions. *Exp Cell Res*, 282(2), 101-109.
- Miyamoto, A., Weinmaster, G., & Editor-in-Chief: Larry, R. S. (2009). Notch Signal Transduction: Molecular and Cellular Mechanisms *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1259-1268). Oxford: Academic Press.
- Monet-Lepretre, M., Bardot, B., Lemaire, B., Domenga, V., Godin, O., Dichgans, M., . . . Joutel, A. (2009). Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain*, 132(Pt 6), 1601-1612. doi: 10.1093/brain/awp049
- Mrad, A., & Cardozo, C. (1999). Programa global para la investigación biológica y biomédica en manejo de animales de laboratorio. In U. N. d. C. I. d. biotecnología (Ed.), (Vol. Septiembre). Bogotá.
- Munoz-Sanjuan, I., Cooper, M. K., Beachy, P. A., Fallon, J. F., & Nathans, J. (2001). Expression and regulation of chicken fibroblast growth factor homologous factor (FHF)-4 during craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*, 220(3), 238-245. doi: 10.1002/1097-0177(20010301)220:3<238::aid-dvdy1104>3.0.co;2-t
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., & Lewis, J. (1996). A Chick Homologue of Serrate and Its Relationship with Notch and Delta Homologues during Central Neurogenesis. *174*(2), 233-247. doi: 10.1006/dbio.1996.0069
- Narumi, Y., Min, B. J., Shimizu, K., Kazukawa, I., Sameshima, K., Nakamura, K., . . . Nishimura, G. (2013). Clinical consequences in truncating mutations in exon 34 of NOTCH2: report of six patients with Hajdu-Cheney syndrome and a patient with serpentine fibula polycystic kidney syndrome. *Am J Med Genet A*, 161(3), 518-526. doi: 10.1002/ajmg.a.35772
- Nichols, J. T., Miyamoto, A., & Weinmaster, G. (2007). Notch signaling--constantly on the move. *Traffic*, 8(8), 959-969. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00592.x
- Nie, X., Wang, Q., & Jiao, K. (2011). Dicer activity in neural crest cells is essential for craniofacial organogenesis and pharyngeal arch artery morphogenesis. *Mech Dev*, 128(3-4), 200-207. doi: 10.1016/j.mod.2010.12.002
- Nimmagadda, S., Geetha-Loganathan, P., Prols, F., Scaal, M., Christ, B., & Huang, R. (2007). Expression pattern of Dll4 during chick embryogenesis. *Histochem Cell Biol*, 128(2), 147-152. doi: 10.1007/s00418-007-0306-6

- Nowell, C., & Radtke, F. (2013). Cutaneous Notch signaling in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(12), a017772. doi: 10.1101/cshperspect.a017772
- Odani, N., Pfaff, S. L., Nakamura, H., & Funahashi, J. (2007). Cloning and developmental expression of a chick G-protein-coupled receptor SCGPR1. *Gene Expr Patterns*, 7(4), 375-380. doi: 10.1016/j.modgep.2006.12.003
- Pauley, S., Lai, E., & Fritsch, B. (2006). Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev Dyn*, 235(9), 2470-2482. doi: 10.1002/dvdy.20839
- Paxton, C. N., Bleyl, S. B., Chapman, S. C., & Schoenwolf, G. C. (2010). Identification of differentially expressed genes in early inner ear development. *Gene Expr Patterns*, 10(1), 31-43. doi: 10.1016/j.gep.2009.11.002
- Peters, M. A., & Cepko, C. L. (2002). The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments. *Dev Biol*, 251(1), 59-73.
- Pole, R. J., Qi, B. Q., & Beasley, S. W. (2002). Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol*, 167(1), 269-271.
- Porazzi, P., Marelli, F., Benato, F., de Filippis, T., Calebiro, D., Argenton, F., . . . Persani, L. (2012). Disruptions of global and JAGGED1-mediated notch signaling affect thyroid morphogenesis in the zebrafish. *Endocrinology*, 153(11), 5645-5658. doi: 10.1210/en.2011-1888
- Przemeck, G. K., Heinzmann, U., Beckers, J., & Hrabe de Angelis, M. (2003). Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development*, 130(1), 3-13.
- Pujades, C., Kamaid, A., Alsina, B., & Giraldez, F. (2006). *Developmental Biology*, 292(1), 55-67.
- Rahul, D., & Amol, P. (2012). A role of genes in craniofacial growth. *IIOAB Journal*, 3(2), 19-36.
- Ramos, C., Rocha, S., Gaspar, C., & Henrique, D. (2010). Two Notch ligands, Dll1 and Jag1, are differently restricted in their range of action to control neurogenesis in the mammalian spinal cord. *PLoS One*, 5(11), e15515. doi: 10.1371/journal.pone.0015515
- Richardson, R. J., Dixon, J., Jiang, R., & Dixon, M. J. (2009). Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Hum Mol Genet*, 18(14), 2632-2642. doi: 10.1093/hmg/ddp201
- Richter, U., Witter, L., & Kessel, M. (2004). Restricted expression domains of Ezrin in developing epithelia of the chick. *Gene Expr Patterns*, 4(2), 199-204. doi: 10.1016/j.modgep.2003.08.008
- Richtsmeier, J. T., & Flaherty, K. (2013). Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol*, 125(4), 469-489. doi: 10.1007/s00401-013-1104-y

- Rodrigues, S., Santos, J., & Palmeirim, I. (2006). Molecular characterization of the rostral-most somites in early somitic stages of the chick embryo. *Gene Expr Patterns*, 6(7), 673-677. doi: 10.1016/j.modgep.2006.01.004
- Rodriguez, S., Sickles, H. M., DeLeonardis, C., Alcaraz, A., Gridley, T., & Lin, D. M. (2008). Notch2 is required for maintaining sustentacular cell function in the adult mouse main olfactory epithelium. *Developmental Biology*, 314(1), 40–58. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.056
- Rogers, C. D., Phillips, J. L., & Bronner, M. E. (2013). Elk3 is essential for the progression from progenitor to definitive neural crest cell. *Dev Biol*, 374(2), 255-263. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.12.009
- Sale, S., Lafkas, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch2 genetic fate mapping reveals two previously unrecognized mammary epithelial lineages. *Nat Cell Biol*, 15(5), 451-460. doi: 10.1038/ncb2725
- Sato, Y., Watanabe, T., Saito, D., Takahashi, T., Yoshida, S., Kohyama, J., . . . Takahashi, Y. (2008). Notch mediates the segmental specification of angioblasts in somites and their directed migration toward the dorsal aorta in avian embryos. *Dev Cell*, 14(6), 890-901. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.024
- Schellpfeffer, M. A., Bolender, D. L., & Kolesari, G. L. (2007). *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(5), 751-761.
- Sekine, C., Koyanagi, A., Koyama, N., Hozumi, K., Chiba, S., & Yagita, H. (2012). Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis Res Ther*, 14(2), R45. doi: 10.1186/ar3758
- Shigetani, Y., Nobusada, Y., & Kuratani, S. (2000). Ectodermally derived FGF8 defines the maxillomandibular region in the early chick embryo: epithelial-mesenchymal interactions in the specification of the craniofacial ectomesenchyme. *Dev Biol*, 228(1), 73-85. doi: 10.1006/dbio.2000.9932
- Shimizu, K., Chiba, S., Kumano, K., Hosoya, N., Takahashi, T., Kanda, Y., . . . Hirai, H. (1999). Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem*, 274(46), 32961-32969.
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Hamada, Y., & Hirai, H. (2002). Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(4), 775-779. doi: 10.1006/bbrc.2002.6528
- Siar, C. H., Nakano, K., Han, P. P., Nagatsuka, H., Ng, K. H., & Kawakami, T. (2010). Differential expression of Notch receptors and their ligands in desmoplastic ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*, 39(7), 552-558. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00871.x
- Siar, C. H., Nakano, K., Ng, K. H., Tomida, M., Nagatsuka, H., & Kawakami, T. (2010). Squamous odontogenic tumor of the mandible: a case report demonstrating immunoeexpression of Notch1, 3, 4, Jagged1 and Delta1. *Eur J Med Res*, 15(4), 180-184.

- Simard, A., Di Pietro, E., & Ryan, A. K. (2005). Gene expression pattern of Claudin-1 during chick embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 5(4), 553-560. doi: 10.1016/j.modgep.2004.10.009
- Simpson, M. A., Irving, M. D., Asilmaz, E., Gray, M. J., Dafou, D., Elmslie, F. V., . . . Trembath, R. C. (2011). Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet*, 43(4), 303-305. doi: 10.1038/ng.779
- Solecki, D. J., Liu, X. L., Tomoda, T., Fang, Y., & Hatten, M. E. (2001). Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*, 31(4), 557-568.
- Stern, C. D., Yu, R. T., Kakizuka, A., Kintner, C. R., Mathews, L. S., Vale, W. W., . . . Umesono, K. (1995). Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo. *Dev Biol*, 172(1), 192-205. doi: 10.1006/dbio.1995.0015
- Sun, D., Baur, S., & Hay, E. D. (2000). Epithelial–Mesenchymal Transformation Is the Mechanism for Fusion of the Craniofacial Primordia Involved in Morphogenesis of the Chicken Lip. *Developmental Biology*, 228(2), 337-349.
- Swartz, M. E., Nguyen, V., McCarthy, N. Q., & Eberhart, J. K. (2012). Hh signaling regulates patterning and morphogenesis of the pharyngeal arch-derived skeleton. *Dev Biol*, 369(1), 65-75. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.05.032
- Szabo-Rogers, H. L., Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Fu, K. K., & Richman, J. M. (2008). FGF signals from the nasal pit are necessary for normal facial morphogenesis. *Dev Biol*, 318(2), 289-302. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.03.027
- Talora, C., Campese, A. F., Bellavia, D., Felli, M. P., Vacca, A., Gulino, A., & Screpanti, I. (2008). Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta*, 1782(9), 489-497. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.06.008
- Tavares, A. L., Garcia, E. L., Kuhn, K., Woods, C. M., Williams, T., & Clouthier, D. E. (2012). Ectodermal-derived Endothelin1 is required for patterning the distal and intermediate domains of the mouse mandibular arch *Dev Biol*: 2012 Elsevier Inc.
- Thakur, J. S., Shekar, V., Saluja, M., & Mohindroo, N. K. (2013). Coexistence of bilateral first and second branchial arch anomalies. *BMJ Case Rep*, 2013. doi: 10.1136/bcr-2013-008698
- Urs, S., Roudabush, A., O'Neill, C. F., Pinz, I., Prudovsky, I., Kacer, D., . . . Small, D. (2008). Soluble forms of the Notch ligands Delta1 and Jagged1 promote in vivo tumorigenicity in NIH3T3 fibroblasts with distinct phenotypes. *Am J Pathol*, 173(3), 865-878. doi: 10.2353/ajpath.2008.080006
- Vargesson, N., Patel, K., Lewis, J., & Tickle, C. (1998). Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev*, 77(2), 197-199.

- Wall, N. A., & Hogan, B. L. (1995). Expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), fibroblast growth factor-8 (FGF-8) and sonic hedgehog (SHH) during branchial arch development in the chick. *Mech Dev*, 53(3), 383-392.
- Wang, M. M. (2011). Notch signaling and Notch signaling modifiers. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(11), 1550-1562. doi: 10.1016/j.biocel.2011.08.005
- Yamagishi, T., Ando, K., Nakamura, H., & Nakajima, Y. (2012). Expression of the Tgfbeta2 gene during chick embryogenesis. *Anat Rec (Hoboken)*, 295(2), 257-267. doi: 10.1002/ar.22400
- Yamamoto, S., Charng, W. L., Rana, N. A., Kakuda, S., Jaiswal, M., Bayat, V., . . . Bellen, H. J. (2012). A mutation in EGF repeat-8 of Notch discriminates between Serrate/Jagged and Delta family ligands. *Science*, 338(6111), 1229-1232. doi: 10.1126/science.1228745
- Yavropoulou, M. P., & Yovos, J. G. (2014). The role of notch signaling in bone development and disease. *Hormones (Athens)*, 13(1), 24-37.
- Yelick, P. C., & Schilling, T. F. (2002). Molecular dissection of craniofacial development using zebrafish. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(4), 308-322.
- Yuan, Z., Friedmann, D. R., VanderWielen, B. D., Collins, K. J., & Kovall, R. A. (2012). Characterization of CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) mutants reveals differences in signaling mediated by Notch1 and Notch2. *J Biol Chem*, 287(42), 34904-34916. doi: 10.1074/jbc.M112.403287
- Zaifullah, S., Yunus, M. R., & See, G. B. (2013). Diagnosis and treatment of branchial cleft anomalies in UKMMC: a 10-year retrospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270(4), 1501-1506. doi: 10.1007/s00405-012-2200-7
- Zhang, S., Loch, A. J., Radtke, F., Egan, S. E., & Xu, K. (2013). Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways. *Dev Dyn*, 242(6), 678-686. doi: 10.1002/dvdy.23965
- Zhang, Y., Lam, O., Nguyen, M. T., Ng, G., Pear, W. S., Ai, W., . . . Liu, C. Y. (2013). Mastermind-like transcriptional co-activator-mediated Notch signaling is indispensable for maintaining conjunctival epithelial identity. *Development*, 140(3), 594-605. doi: 10.1242/dev.082842
- Zhou, Y., Tanzie, C., Yan, Z., Chen, S., Duncan, M., Gaudenz, K., . . . Xie, T. (2013). Notch2 regulates BMP signaling and epithelial morphogenesis in the ciliary body of the mouse eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), 8966-8971. doi: 10.1073/pnas.1218145110
- Zhu, M. Y., Gasperowicz, M., & Chow, R. L. (2013). The expression of NOTCH2, HES1 and SOX9 during mouse retinal development. *Gene Expr Patterns*, 13(3-4), 78-83. doi: 10.1016/j.gep.2012.12.001
- Zuniga, E., Stellabotte, F., & Crump, J. G. (2010). Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face *Development* (Vol. 137, pp. 1843-1852). England.